

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAIARA LAZARETTI RODRIGUES DO PRADO

**PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR QSOX1
EXTRACELULAR ATIVA E INATIVA**

Curitiba

2016

MAIARA LAZARETTI RODRIGUES DO PRADO

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS POR QSOX1
EXTRACELULAR ATIVA E INATIVA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Co-orientadora: Dra. Beatriz Essenfelder Borges

CURITIBA
2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Prado, Maiara Lazareti Rodrigues do
Proliferação de células musculares lisas por QSOX1 extracelular ativa e inativa./ Maiara Lazareti Rodrigues do Prado. – Curitiba, 2016.
66 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lia Sumie Nakao

Co-orientadora: Beatriz Essenfelder Borges

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Proliferação celular. 2. Superóxidos. I. Título II. Nakao, Lia Sumie. III. Borges, Beatriz Essenfelder. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**"Proliferação de células musculares lisas por QSOX1 extracelular
ativa e inativa"**

por

MAIARA LAZARETTI RODRIGUES DO PRADO

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof^ª. Dr^ª. Lia Sumie Nakao – Presidente

Prof. Dr. Nilson I. Zanchin

Prof^ª. Dr^ª. Edneia A. Cavalieri

Curitiba, 22 de janeiro de 2016.

Dedico aos meus pais Antônio Rodrigues do Prado e Santina Lazaretti Rodrigues do Prado por serem meus grandes admiradores, que sempre me apoiou e incentivou durante toda a minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda força espiritual, por ter me concedido paciência, sabedoria e compreensão necessárias durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais Antônio Rodrigues do Prado e Santina Lazaretti Rodrigues do Prado, por serem meus grandes admiradores, que sempre me apoiou e incentivou durante toda a minha vida acadêmica.

À minha orientadora Dra. Lia Sumie Nakao, pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos tão valiosos neste trabalho.

À minha co-orientadora Dr. Beatriz E. Borges, pela amizade, pela paciência e por sempre estar me ajudando.

Aos meus irmãos Mayza Lazaretti do Prado, Marco Antônio do Prado, Marcelo Lazaretti Rodrigues do Prado, pois mesmos distantes estão sempre presente, me ajudando e me apoiando.

À Minha irmã Márcia Lazaretti do Prado pelo cuidado, carinho, admiração que sempre teve comigo, pelos dias maravilhosos que me proporcionou que nunca vou esquecer e por ser o meu anjo da guarda.

Aos meus queridos amigos Zaine, Sze, Larissa, Luiz, Letícia, Ingrid, Carol, Roberta e Camila pela amizade, por estarem do meu lado sempre, me ajudando, “puxando” minha orelha e deixando os meus dias mais felizes.

Ao meu namorado Marcio Luís Ferrari Filho por sempre me compreender, apoiar, pelo carinho, cumplicidade e por tornar os momentos difíceis menos árduos.

Aos meus amigos do mestrado, Paulo, Cristiano, Giane, Edson e Viviana pelo carinho e amizade durante todo o mestrado.

Aos professores Silvio Marques Zanata, Adriana Mercadante e Giseli Klassen pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao programa de Pós- Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela bolsa concedida (CAPES) e ao INCT *Redoxoma* - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca examinadora por ter aceitado o convite e pelas correções sugeridas.

Enfim, agradeço a todos que de alguma maneira me apoiaram para terminar esse trabalho. Muito Obrigada!!!

"Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!"

Mário Quintana

RESUMO

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) são flavoenzimas com atividade tiol oxidase, capazes de oxidar tiois a dissulfeto reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio. A QSOX1b foi detectada em sobrenadantes de células musculares lisas e células progenitoras de músculo liso em abordagens proteômicas. Os estudos com células musculares lisas vasculares (VSMC), mostraram que a QSOX1b induz um aumento na proliferação e na migração destas células, através de processos independente e dependente da atividade sulfidril oxidase, respectivamente. Entretanto, o mecanismo molecular que transduz o sinal mitogênico disparado pela QSOX1 extracelular não foi investigado. O objetivo desse trabalho foi estudar a proliferação de VSMC estimulada pela QSOX1b recombinante ou secretada por célula eucariótica (HEK 293T) super-expressando QSOX1. Foi comprovado o efeito proliferativo das QSOX1b recombinantes selvagem e mutada (75 e 100 nM) em VSMC em relação ao controle negativo, utilizando o ensaio de cristal violeta e pela contagem direta na câmara de Neubauer. Os meios condicionados de HEK 293T superexpressando QSOX1b selvagem e mutada também induziram a proliferação de VSMC. A inibição de NADPH oxidase por difenileniodônio (DPI), assim como a pré-incubação das células com Peg-Sod, diminuiu significativamente a proliferação de VSMC, indicando a participação do radical superóxido produzido por Nox. Dados prévios nossos mostravam que a pré-incubação com Peg-Cat não alterava a taxa proliferativa. Nós confirmamos estes dados, o quais sugerem que as QSOX1b estimulam a proliferação de uma forma pouco usual. A pré-incubação de VSMC com um inibidor da via de Ras (FPTIII) levou a uma diminuição da proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b de forma significativa. Finalmente, a incubação das VSMC com ambas as formas da QSOX1b recombinantes por 10 e 30 minutos estimularam a fosforilação de tirosinas e de treonina, evidenciado por western blotting. Os resultados obtidos confirmam que as QSOX1b selvagem e mutada induzem a proliferação de VSMC de forma dependente e independente da atividade enzimática. Além disso, superóxido, gerado pela NADPH oxidase, a proteína Ras e a fosforilação de tirosinas e treoninas parecem estar associados com a proliferação induzida pela QSOX1b.

Palavras-chave: Quiescina sulfidril oxidase; célula muscular lisa vascular; proliferação celular, superóxido, Ras.

ABSTRACT

Quiescin-Sulfhydryl Oxidase 1 (QSOX1) are flavoenzymes with thiol oxidase activity that are able to oxidize thiols to disulfide, through reduction of molecular oxygen to hydrogen peroxide. QSOX1 was detected in the supernatant of smooth muscle cells and smooth muscle progenitor cells through proteomics approaches. Studies using vascular smooth muscle cells (VSMC) have shown that QSOX1b induces an increase both in proliferation and migration of these cells, through processes independent and dependent of the sulfhydryl oxidase activity, respectively. However, the molecular mechanism which transduces the mitogenic signal that is triggered by extracellular QSOX1 was not investigated. The aim of this project was to study the VSMC proliferation stimulated by recombinant QSOX1 or secreted protein by eukaryotic cell (HEK 293T) super expressing QSOX1. The proliferative effect of recombinant QSOX1b, both wild type and mutated (75 and 100 nM), was confirmed related to the negative control, through crystal violet assay and direct counting with Neubauer chamber. The conditioned media of HEK 293T super expressing QSOX1b both wild type and mutated also induced the VSMC proliferation. The inhibition of NADPH oxidase by diphenyleneiodonium (DPI), as well as pre-incubation of the cells in Peg-Sod have significantly reduced the proliferation of VSMC, which indicates the participation of the superoxide radical produced by Nox. Previous data have shown that the pre-incubation in Peg-Cat was not able to alter the proliferative rate. We have confirmed these data, which suggest that QSOX1b stimulates the cell proliferation in an unusual manner. The pre-incubation of VSMC in a Ras pathway inhibitor (FTPIII) led to a significantly decrease in VSMC proliferation induced by QSOX1b. At last, the incubation of VSMC in recombinant forms of QSOX1b for 10 and 30 minutes have stimulated the phosphorylation of tyrosine and threonine, evidenced by western blot assay. The obtained results confirm that QSOX1b both wild type and mutated induce the proliferation of VSMC in an enzymatic activity dependent and independent way. Furthermore, the superoxide produced by NADPH oxidase, Ras protein, and the phosphorylation of tyrosine and threonine seem to be associated with the cell proliferation induced by QSOX1b.

Keywords: Quiescin-sulfhydryl oxidase; vascular smooth muscle cell; cell proliferation; superoxide; Ras.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Representação dos domínios das isoformas longa e curta da QSOX1.....	17
Figura 2 Representação da transferência de elétrons do substrato reduzido.	18
Figura 3 Estrutura de QSOX humana.....	19
Figura 4 Intensidade de expressão das isoformas de QSOX.	20
Figura 5 Imagem das células musculares lisas vasculares (VSMC) migrando do tecido da artéria aorta torácica de ratos Wistar.....	34
Figura 6 Identificação da VSMC por imunofluorescência.	35
Figura 7 Representação do vetor pET-32a(+) invitrogen.	36
Figura 8 Representação da sequência de aminoácidos da proteína QSOX1b selvagem (a) e mutada (b) clonadas no vetor pET 32 a.....	37
Figura 9 Purificação das QSOX1b recombinantes (selvagem e mutada).	38
Figura 10 Reações do método indireto de quantificação da atividade quiescina sulfidril oxidase por fluorescência contínua.	38
Figura 11 Atividade enzimática das enzimas recombinantes.....	39
Figura 12 Clivagem da QSOX recombinante por trombina.	40
Figura 13 Efeito na proliferação de VSMC pelo ensaio de cristal violeta.	41
Figura 14 Efeito da QSOX1b na proliferação de VSMC por contagem direta.	42
Figura 15 Efeito da QSOX1b superexpressa por célula eucariótica em VSMC.	43
Figura 16 Confirmação da transfeção de Qsox1b-HA em células HEK 293.	44
Figura 17 Efeito da NADPH oxidase na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.	45
Figura 18 Efeito da PEG-CAT na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.	46
Figura 19 Efeito do PEG-SOD na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.	47
Figura 20 A via de Ras envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.....	48
Figura 21 Western Blotting com anti fosfotirosina em células 3T3.....	49
Figura 22 Western Blotting com anti fosfotirosina em VSMC.....	50
Figura 23 Efeito do estímulo da Qsox1b WT em VSMC na fosforilação de resíduos de tirosina em vários tempos.....	51
Figura 24 Efeito do estímulo da Qsox1b Mut em VSMC na fosforilação de resíduos de tirosina em vários tempos.....	52
Figura 25 Efeito da fosfotirosina em VSMC induzida pela QSOX1b.	53
Figura 26 Efeito da fosfotreonina em VSMC induzida pela QSOX1b.....	54

LISTA DE SIGLAS

ALR	<i>Augmenter of Liver Regeneration</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclina
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPI	Difenilenoiodonio
DTT	Ditiotreitol
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Ero	<i>Endoplasmic reticulum oxidase</i>
Erv	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FPTIII	Farnesyltransferase inhibitors
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HVA	<i>Homovanilic acid</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
MMP	Metaloprotease
QSOX1	Proteína recombinante selvagem para QSOX
QSOX1C452S	Proteína recombinante com mutação sitio dirigida
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase
Peg-Cat	Polietileno glicol catalase
Peg- Sod	Polietileno glicol superóxido dismutase
PTK	Proteína tirosina quinase
QSOX1a	Quiescina/ sulfidril oxidase1, isoforma longa
QSOX1b	Quiescina/ sulfidril oxidase1, isoforma curta
RE	Retículo endoplasmático

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	<i>Receptor tyrosine kinases</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBST	Salina tamponada com Tris contendo Tween-20
TRX	Tiorredoxina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Proteína QSOX.....	16
3.2 Proliferação Celular	22
3. OBJETIVO GERAL.....	25
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 CULTURAS CELULARES	26
5.2 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS.....	26
5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	27
5.4 EXPRESSÃO DAS QSOX1B RECOMBINANTES DE CAMUNDONGO SELVAGEM E MUTADA	28
5.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	28
5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEÍCA.....	29
5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SULFIDRIL OXIDASE	29
5.8 CLIVAGEM POR TROMBINA.....	30
5.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	30
5.10 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO COM INIBIDORES FARMACOLÓGICOS.....	31
5.11 ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO	32
5.12 SDS-PAGE.....	32
5.13 WESTERN BLOTTING	33
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6. RESULTADOS	34
6.1 PREPARAÇÃO DAS VSMC E DA RECOMBINANTE QSOX1B	34
6.2 EFEITO DA QSOX1B NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC	40
7.3 SINALIZAÇÃO REDOX ENVOLVIDA NA PROLIFERAÇÃO DE VCMC INDUZIDA PELO QSOX1B.....	44
6.4 ATIVAÇÃO MITOGÊNICA DA VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B	47
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10. ANEXO.....	66

1. INTRODUÇÃO

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) são flavoenzimas com atividade tiol oxidase. Sua função básica é oxidar tiois a dissulfeto reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (Kodali e thorpe, 2010).

O gene *QSOX1* pode sofrer processamento alternativo do transcrito, levando a formação de duas isoformas de QSOX1; uma isoforma longa (QSOX1a), com um domínio transmembrânico na porção C-terminal (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007), e uma isoforma curta (QSOX1b) (RADOM *et al.*, 2006), que é secretada.

Estruturalmente, as duas isoformas resultam da fusão de duas grandes superfamílias: tiorredoxina (TRX) e *essential for respiration and vegetative growth* (ERV). A sequência primária da QSOX1 consiste em um domínio TRX1 na porção N-terminal, seguido de um domínio TRX2 e um domínio rico em hélices (HRR), o qual é exclusivo das QSOX (COPPOCK *et al.*, 1998). A porção C-terminal consiste no domínio ALR/ERV.

A proteína QSOX já foi encontrada no retículo endoplasmático, Golgi e vesículas secretoras (KODALI & THORPE, 2010). A QSOX1a, por apresentar um domínio transmembrânico, localiza-se no complexo de Golgi e parece participar do dobramento oxidativo intracelular de proteínas com destino extracelular (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007). E a sua isoforma curta está localizada no Golgi, mas predominantemente no meio extracelular, como demonstrado no líquido seminal de rato (BENAYOUN *et al.*, 2001) e pela presença (ZANATA *et al.*, 2005) e atividade (ISRAEL *et al.*, 2014) em soro de mamífero.

Nosso grupo recentemente reportou que a expressão da QSOX1b é alta no tecido neointimal produzido após lesão por cateter-balão em carótidas de rato, sendo parcialmente responsável pelo crescimento da neoíntima (BORGES *et al.*, 2015).

Os estudos *in vitro*, com células musculares lisas vasculares (VSMC), mostraram que a QSOX1 extracelular induz um aumento na proliferação e na

migração destas células, através de processos independente e dependente da atividade sulfidril oxidase, respectivamente (BORGES *et al.*, 2015).

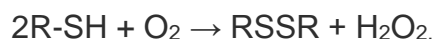
Neste trabalho, confirmamos os dados já publicados por Borges et al (2015), no que diz respeito à indução da proliferação de VSMC por QSOX1b. Indicamos também que a via de superóxido está envolvida neste processo de proliferação, bem como a via de sinalização Ras.

Além disso, mostramos que a QSOX1b ativa vias de fosforilação de várias proteínas quinases intracelulares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteína QSOX

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) são flavoenzimas com atividade tiol oxidase, ou seja, capazes de oxidar tiois a dissulfeto reduzindo o oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (reação 1) (Kodali e thorpe, 2010).



Reação 1: Oxidação de grupos sulfidril a dissulfetos com a redução do oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

FONTE: Kodali e thorpe, 2010.

O gene *QSOX1* pode sofrer processamento alternativo do transcrito, levando a formação de duas isoformas de QSOX1; uma isoforma longa (QSOX1a), com um domínio transmembrânico na porção C-terminal (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007), e uma isoforma curta (QSOX1b) (RADOM *et al.*, 2006) que é secretada. Em humanos, a proteína QSOX1a contém 747 aminoácidos, e a QSOX1b, 604 aminoácidos (COPPOCK & THORPE, 2006; KODALI & THORPE, 2010). Estruturalmente, as duas isoformas resultam da fusão de duas grandes superfamílias: tiorredoxina (TRX) e *essential for respiration and vegetative growth* (ERV). A sequência primária da QSOX1 consiste em um domínio TRX1 na porção N-terminal, seguido de um domínio TRX2 e um domínio rico em hélices (HRR), o qual é exclusivo das QSOX (COPPOCK *et al.*, 1998). A porção C-terminal consiste no domínio ALR/ERV (Figura 1).

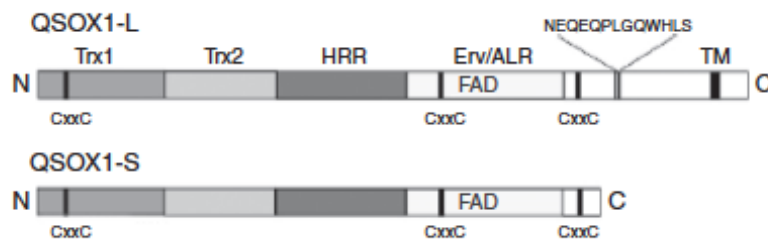


Figura 1 Representação dos domínios das isoformas longa e curta da QSOX1.

As estruturas mostram os domínios TRX1, TRX2, HRR (helix rich domain) e ERV/ALR. Os 3 motivos CxxC, a região de ligação do FAD e o domínio transmembrânico (TM) são também mostrados.

FONTE: Figura adaptada de KODALI & THORPE (2010).

O domínio TRX1 é composto por um motivo CxxC conservado e redox-ativo, enquanto o domínio TRX2 apresenta um baixo alinhamento com a superfamília Trx (COPPOCK & THORPE, 2006). O domínio ERV/ALR é um módulo proteico de cerca de 80-100 aminoácidos, que possui atividade sulfidril oxidase devido à presença de um motivo CxxC (2 resíduos de cisteína flanqueando 2 resíduos de aminoácidos) conservado e um grupo prostético FAD. Proteínas com domínio ERV/ALR incluem as proteínas de levedura ERV1 e ERV2, a proteína homóloga de mamíferos augmenter of liver regeneration ou hepatopoietina (ALR ou HPO) e a proteína endoplasmic reticulum oxidase 1 (Ero1p) (COPPOCK & THORPE, 2006). ERV1p é uma proteína essencial para leveduras, presente no espaço intermembrana mitocondrial, e importante para a biogênese mitocondrial. A ERV2p não é essencial para a sobrevivência da levedura, é encontrada no retículo endoplasmático (RE) e sua função parece estar relacionada ao dobramento oxidativo no lúmen do RE, juntamente com a Ero1p (SEVIER, 2012). Já a ALR de mamíferos é uma proteína muito interessante. ALR foi inicialmente caracterizada como um fator importante no processo de regeneração hepática. Ela é encontrada em diversas localizações celulares, como no espaço intermembrana mitocondrial (LANGE *et al.*, 2001), no citossol (HOFHAUS *et al.*, 1999), no núcleo (WANG *et al.*, 2004) e no meio extracelular (WANG *et al.*, 1999); (LI *et al.*, 2000). Entre suas funções, destacam-se a participação na biogênese mitocondrial (LANGE *et al.*, 2001) e o estímulo mitogênico pela ALR extracelular após hepatectomia (GANDHI *et al.*, 1999), sendo este último efeito específico para células hepáticas. O papel pró-proliferativo da ALR foi mais detalhadamente estudado pelo grupo de He, o qual

demonstrou que ALR estimula a proliferação de células de hepatoma através de um sinal iniciado por um receptor de superfície celular (WANG *et al.*, 1999) que leva a fosforilação precoce de MEK e ERK (LI *et al.*, 2000).

Como já mencionado acima, os domínios TRX1 e ALR/ERV possuem 1 e 2 motivos CxxC, respectivamente, com 2 resíduos de cisteína cada. A atividade sulfidril oxidase está diretamente associada à presença de tais motivos. Estudos com a QSOX1b humana recombinante mostraram que, enquanto o segundo motivo CxxC é redox-inativo, o primeiro (C₇₀xxC₇₃) e o segundo (C₄₄₉xxC₄₅₂) motivos, localizados nos domínios TRX1 e ALR/ERV, respectivamente, são cruciais para a atividade enzimática. De fato, a transferência de dois elétrons do substrato reduzido (tiois) segue a ordem: substrato reduzido → C₇₀xxC₇₃ → C₄₄₉xxC₄₅₂ → FAD → O₂.

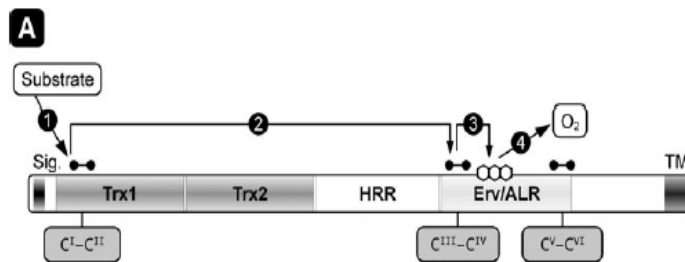


Figura 2 Representação da transferência de elétrons do substrato reduzido.

A figura mostra a proteína QSOX1 e seus domínios TRX1 e ERV/ALR sendo cruciais para produzir atividade enzimática, portanto, sendo redox ativos.

FONTE: (KODALI & THORPE, 2010)

No estado basal, a distância determinada por estudos cristalográficos entre o primeiro e o segundo motivos é grande (40Å), impedindo uma transferência eletrônica. Contudo, durante a catálise, os domínios TRX1 e ALR/ERV são reorientados e aproximados, permitindo a reação redox entre os resíduos de cisteínas (ALON *et al.*, 2012) (figura 3). Estudos recentes mostraram que formas truncadas da QSOX1b humana recombinante, sem algumas regiões do domínio HRR ou sem a região *downstream* do terceiro CxxC, perdem a capacidade de ligar FAD, e portanto, perdem a atividade enzimática (ZHENG *et al.*, 2012).

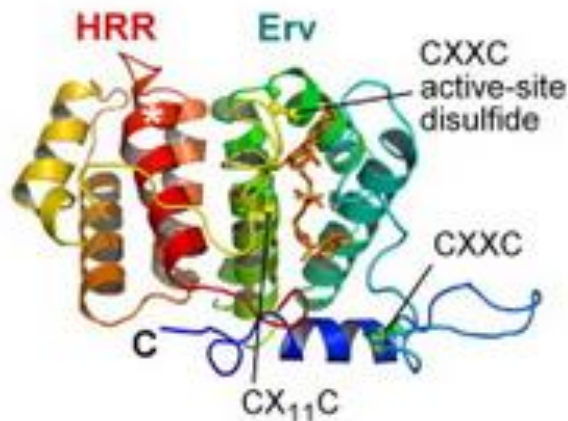


Figura 3 Estrutura de QSOX humana.

Estudo cristalográfico da estrutura da HsQSOX ²⁸⁶⁻⁵⁴⁶.

FONTE: (ALON *et al.*, 2010)

Exceto em fungos e leveduras, a QSOX1 parece ser expressa em todos outros organismos, como *C. Elegans* (COPPOCK *et al.*, 1998), insetos (Magalhães *et al.*, 2008), mamíferos, aves, *T. Brucei* (THORPE & COPPOCK, 2007), *A. thaliana* (Limor-Waisberg *et al.*, 2012; SEVIER, 2012). A expressão de QSOX1 já foi demonstrada em diversos ambientes, como trato reprodutor masculino (Ostrowski e Kestler, 1980; (BENAYOUN *et al.*, 2001), fibroblastos de pulmão (COPPOCK *et al.*, 1993), tecido uterino (MUSARD *et al.*, 2001), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (COPPOCK & THORPE, 2006), encéfalo (MAIRET-COELLO *et al.*, 2004; MAIRET-COELLO *et al.*, 2005), epiderme (MATSUBA *et al.*, 2002), glândula sebácea, placenta (THORPE & COPPOCK, 2007) e leite bovino (JAJE *et al.*, 2007).

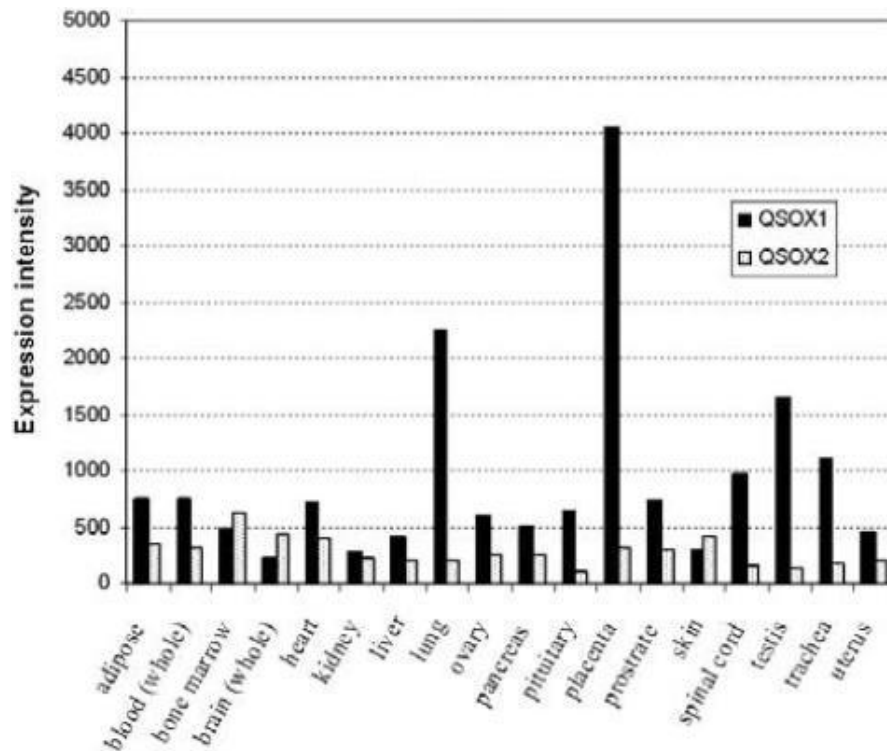


Figura 4 Intensidade de expressão das isoformas de QSOX.

QSOX1 representa a isoforma com domínio transmembrana e QSOX2 representa a proteína de sistema nervoso.

FONTE: COPPOCK & THORPE (2006).

Recentemente, a presença da QSOX1 foi também demonstrada em células tumorais de próstata (OUYANG *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2009), mama (PERNODET *et al.*, 2012; KATCHMAN *et al.*, 2013; SOLOVIEV *et al.*, 2013), pâncreas (KATCHMAN *et al.*, 2011) e neuroblastoma (ARAUJO *et al.*, 2014). Acredita-se que a isoforma predominante nestes ambientes seja a QSOX1b, pois parece que a expressão da QSOX1a é exclusiva do tecido cerebral (RADOM *et al.*, 2006). Nosso grupo demonstrou que a QSOX1 está presente em tecidos fetais, como soro (ZANATA *et al.*, 2005) e aqueles derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (PORTES *et al.*, 2008). Nesse trabalho, mostramos ainda que a expressão desta enzima em tecidos epiteliais aumenta durante o desenvolvimento fetal, indicando um papel regulatório na programação embriogênica.

Intracelularmente, QSOX1 já foi descrita no retículo endoplasmático (apesar da QSOX1 não apresentar sequência de retenção no RE), Golgi e vesículas secretoras (KODALI & THORPE, 2010). A QSOX1a, por apresentar um domínio

transmembrânico, localiza-se no complexo de Golgi e parece participar do dobramento oxidativo intracelular de proteínas com destino extracelular (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007). Contudo, esta isoforma também pode sofrer um processamento proteolítico e ser secretada da célula (RUDOLF *et al.*, 2013). Já a QSOX1b apresenta-se em Golgi, mas predominantemente no meio extracelular, como demonstrado no líquido seminal de rato (BENAYOUN *et al.*, 2001) e pela presença (ZANATA *et al.*, 2005) e atividade (ISRAEL *et al.*, 2014) em soro de mamífero.

Apesar de todos estes dados de catálise e expressão, as possíveis funções da QSOX1 não estão bem esclarecidas. Devido a atividade sulfidril oxidase, acredita-se que o dobramento oxidativo de proteínas secretadas seja um potencial papel da QSOX1, mas poucas evidências experimentais mostraram de forma clara este papel. Um trabalho recente mostrou que QSOX1 recombinante extracelular é importante para incorporar trímeros solúveis de laminina na matriz extracelular, em um processo dependente da atividade sulfidril oxidase (ILANI *et al.*, 2013). Também, QSOX1 extracelular tem sido recentemente associada a progressão tumoral (OUYANG *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2009; KATCHMAN *et al.*, 2013; SOLOVIEV *et al.*, 2013), devido à ativação da proliferação celular e de metaloproteases (KATCHMAN *et al.*, 2011; KATCHMAN *et al.*, 2013). Artigos anteriores, contudo, demonstraram que a QSOX1 regula negativamente o ciclo celular (COPPOCK *et al.*, 1993; COPPOCK *et al.*, 2000; MUSARD *et al.*, 2001; HELLEBREKERS *et al.*, 2007). Portanto, apesar deste montante de dados, ainda faltam informações sobre a QSOX1 em situações fisiológicas.

Recentemente, a QSOX1 tem sido descrita no sistema cardiovascular. A QSOX1 foi detectada em sobrenadantes de células musculares lisas e células progenitoras de músculo liso em abordagens proteômicas (SIMPER *et al.*, 2010), na área necrótica de placas ateroscleróticas (DE ANDRADE *et al.*, 2011) e tem sido considerada um possível marcador de insuficiência cardíaca (MEBAZAA *et al.*, 2012).

Outros estudos mostram que a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que coopera com a QSOX1 durante o dobramento oxidativo e isomerização de proteínas (RANCY & THORPE, 2008), regula a atividade da NADPH oxidase vascular (JANISZEWSKI *et al.*, 2005), que é uma proteína chave no processo de reparo

vascular após lesão por cateter balão (SZOCS *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2009). Neste contexto, nosso grupo recentemente reportou que a expressão da QSOX1 é alta no tecido neointimal produzido após lesão por cateter-balão em carótidas de rato, sendo parcialmente responsável pelo crescimento da neoíntima (BORGES *et al.*, 2015).

3.2 Proliferação Celular

As proteínas quinases (PK) são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP, para resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser). As PTKs são enzimas vitais em processos de sinalização, proliferação, migração e diferenciação celular (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010).

Os fatores de crescimento (EGF e VEGF) são produzidos por diversas células e têm a capacidade de estimular o crescimento celular, eles exercem seus efeitos por uma ligação com receptores de membrana. Portanto, a sinalização intracelular é quando ocorre o contato entre o ligante (fator de crescimento) e seu receptor na forma monomérica. Após a ligação, ocorre um processo de dimerização, resultando na fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre ATP e resíduos de tirosina, treonina e serina. Em seguida, ocorre a fosforilação de proteínas-alvo que possuem o domínio SH2, o qual representa um sítio de reconhecimento para as PK. A fosforilação intracelular inicia uma cascata de reações citoplasmáticas que culmina em diversas respostas celulares, iniciando, deste modo a proliferação celular (LEMMON & SCHLESSINGER, 2010).

As reações citoplasmáticas ocorrem através de complexas interações enzimáticas, que constituem as vias de sinalização. As principais vias de sinalização dos fatores de crescimento envolvem a via PI3K/Akt (Fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase e a via 61 Ras/Raf/MEK/MAPK, as quais têm funções importantes no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular (MCCUBREY *et al.*, 2007).

As vias Ras/Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt desempenham papéis críticos na transmissão de sinais provenientes dos receptores de fatores de crescimento para

regular a expressão gênica e evitar a apoptose. Estas vias interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos a carcinogênese (MCCUBREY *et al.*, 2007).

No contexto da proliferação celular, o gene da QSOX1 foi inicialmente identificado em bibliotecas de fibroblastos em quiescência celular (COPPOCK, 1993; COPPOCK *et al.*, 2000). Nestes trabalhos, Coppock relatou que a expressão QSOX1 está relacionada com a parada do crescimento celular (saída do ciclo celular – fase G0).

O nosso grupo mostrou que a QSOX1 extracelular (secretada) inicia o processo de proliferação de VSMC, ou seja, propicia a saída dessa célula da fase G0 para G1. E esse mecanismo de proliferação celular induzido pela QSOX1b em VSMC possivelmente está relacionado a receptores de membrana, já que essa molécula está presente no meio extracelular e parece desencadear cascatas de sinalização proliferativas intracelularmente (Borges *et al.* 2015).

A QSOX1 é uma enzima que oxida tióis durante o dobramento de proteínas, gerando uma espécie reativa de oxigênio como produto final da sua reação enzimática. Muitas enzimas geradoras de ROS estão envolvidas na sinalização redox. As NADPH oxidases da família Nox são as principais fontes de ROS com finalidade de sinalização compartimentalizada em várias células (TERADA, 2006), particularmente células vasculares (LEE *et al.*, 2009).

ROS também são cruciais para função celular para manter a homeostasia, tais como a proliferação, migração, sobrevivência e relaxamento vascular (CAI, 2005). Muitos desses processos moleculares incluem a regulação de fatores de sinalização intracelular, em particular relacionadas com ativação da cascata de fosforilação/ desfosforilação (GOUGH & COTTER, 2011). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido pelo superóxido, que sofre um processo de dismutação, que pode ocorrer espontaneamente ou ser catalisado por uma família de enzimas chamadas superóxido dismutase (SOD). O superóxido é produzido por várias enzimas como NADPH oxidase, entre outras vias. Em contraste, a enzima catalase atua depletando o H_2O_2 .

Estudo *in vitro*, com células musculares lisas vasculares (VSMC), mostraram que a QSOX1 extracelular induz um aumento na proliferação e na migração destas

células, através de processos independente e dependente da atividade sulfidril oxidase, respectivamente (BORGES *et al.*, 2015), mostrando que o H_2O_2 não está envolvido no processo de proliferação celular induzido pela Qsox1b. Levando em consideração os dados já publicados pelo nosso grupo, o principal objetivo deste trabalho foi estudar a proliferação de VSMC induzida pela QSOX1 extracelular selvagem e mutada.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a proliferação de VSMC induzida pela QSOX1 extracelular selvagem (ativa) e mutada (inativa).

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar que QSOX1 extracelular induz proliferação de VSMC, de forma independente da atividade enzimática.
- Utilizar DPI, Peg-Sod e FTPIII para analisar o envolvimento de NADPH oxidase, superóxido e Ras, respectivamente, na proliferação VSMC induzida pela Qsox1b extracelular.
- Analisar se QSOX1 extracelular induz aumento na fosforilação de tirosinas, threonina e serina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CULTURAS CELULARES

VSMC foram obtidas de aorta de ratos Wistar, machos de cerca de 2-3 meses de idade. Os ratos foram mortos e a aorta foi coletada e transferida para um tubo com PBS contendo gentamicina 40 µg/mL. Em condições assépticas, a aorta foi lavada com PBS, e a camada adventícia foi removida com a ajuda de um bisturi. A artéria foi cortada longitudinalmente e as células endoteliais foram removidas mecanicamente. Após um enxágue com PBS, a aorta foi cortada em fragmentos, os quais foram plaqueados em placas de 24 poços. A estes fragmentos foram adicionados gotas de DMEM (Life Technologies) contendo 20% soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies) e gentamicina. Após 6-8 h, mais 0,2 mL de meio completo foi adicionado. O meio foi trocado parcialmente a cada 3-4 dias. Após cerca de 10 dias, as células dos vários poços foram coletadas juntas e replaqueadas em placa de 100 mm. A partir daqui, o cultivo segue como de rotina, usando DMEM com 10% SFB (GIBCO) e gentamicina. As células foram usadas nos experimentos até a passagem 7.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do setor de ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, protocolo nº 819/2014. Também empregamos as seguintes células de linhagem: fibroblastos de camundongo (NIH 3T3) e carcinoma de rim humano (HEK293T). Estas células foram cultivadas rotineiramente em meio DMEM (Cultilab) contendo 10% SFB (Cultilab) e gentamicina.

5.2 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS

No método de transfecção, células HEK 293T foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial, Cultilab) adicionado de 10% SFB (Cultilab) e 40 µg/mL de antibiótico Gentamicina (Garamicina Mantecorp) e mantidas em incubadora úmida com tensão de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram transfectadas 24 horas após seu repique, com o plasmídeo de interesse pelo método da co-precipitação de

fosfato de cálcio. Uma alíquota de 12 µg do plasmídeo de interesse foi adicionado na superfície de 750 µl de água ultrapura estéril, seguido de 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 1000 µl de solução BBS2x concentrada (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na₂HPO₄; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8,0 ml de meio MEM acrescido de 0,1% de soro fetal bovino e 40 µg/ml de gentamicina. Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (Nest) contendo células HEK293T com aproximadamente 80% de confluência teve seu meio de cultura retirado e então, a solução de transfecção descrita acima foi gentilmente adicionada. Com essa solução, a placa foi incubada por um período de 5 a 8 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com 5 ml de PBS e adicionado novo meio MEM acrescido de 0,1% de SFB e 40 µg/ml de gentamicina.

5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A confirmação da identidade das VSMC foi realizada pela expressão de actina de músculo liso. Para isso, as células (cerca de 10⁴) foram plaqueadas em lamínulas de 13 mm diâmetro (Knittel). No dia seguinte, foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Os grupos aldeídos foram bloqueados com glicina 0,1 M por 5 min, e a permeabilização foi feita juntamente com o bloqueio (saponina 0,05% e albumina 1% em PBS) por 60 min. Após a incubação com anticorpo actina de musculo liso (1/250 Sigma-Aldrich) na solução de bloqueio por 1 hora, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anti-IgG de camundongo acoplado a um fluoróforo (Alexa 488, Molecular Probes) por 50 min na solução de bloqueio. Após lavagens com PBS, os núcleos foram corados com solução de DAPI, e a lâmina foi montada com Fluormount (Life Technologies).

As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal multifóton, modelo A1 MP+, marca Nikon (NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan) utilizando objetiva 20x (com abertura numérica de 0.75). Para excitação foi utilizado os lasers FITC: 525/50nm e DAPI: 450/50nm, e para emissão utilizou filtro de intervalo entre 500-550nm para FITC e 425-475nm para DAPI.

5.4 EXPRESSÃO DAS QSOX1B RECOMBINANTES DE CAMUNDONGO SELVAGEM E MUTADA

Foram utilizadas duas construções da proteína QSOX1 para realização dos experimentos: a forma selvagem (ativa) e a forma mutada (inativa), obtida através de mutação do primeiro resíduo do segundo motivo CXXC da construção do tipo selvagem, usando o método de megainciador de PCR (Borges et al. 2015). A expressão das enzimas recombinantes foi realizada na cepa bacteriana AD494, que favorece a formação de pontes dissulfeto no citoplasma. Para o processo de transformação das bactérias foram utilizados os antibióticos canamicina e ampicilina (1µg/ml).

Dentre as colônias positivas para o crescimento em meio seletivo, apenas uma colônia para cada vetor (selvagem e mutante) foi selecionada para o preparo do pré-inóculo (10 ml) em meio LB contendo antibióticos. As cepas das bactérias cresceram por incubação por 16 hr a 20° C, sob agitação de 200 rpm. Das culturas resultantes, 5 ml do meio saturado foram inoculados em 1 litro de meio LB/antibióticos. Quando as culturas atingiram uma densidade ótica (D.O.) de 0,4 – 0,6 em 550 nm, adicionamos 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosideo (IPTG) por 16 hrs a 20° C, sob agitação de 200 rpm para a indução da expressão da proteína recombinante. Após a indução com IPTG, a cultura resultante (1litro) da expressão foi sedimentada por centrifugação a 4.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* correspondente a 1 litro de cultura, lavado duas vezes com 40 ml de água deionizada gelada.

5.5 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

O *pellet* resultante foi ressuspendido em 40 ml de tampão de lise nativa (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) e armazenado por 16 horas a -80° C para facilitar a lise bacteriana. Após esta etapa, as suspensões bacterianas foram lisadas por aplicação de alta pressão mecânica fornecida pela prensa de French (French Press). O extrato bacteriano obtido foi submetido à

sedimentação (9.000 x g, por 30 min, a 4° C) e o sobrenadante coletado. A purificação foi realizada por cromatografia (resina de agarose) de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺-NTA (Quiagen), seguindo recomendações do fabricante.

Rapidamente, os sobrenadantes recuperados dos extratos bacterianos foram individualmente incubados sob agitação com 1 ml de resina de níquel (resina pré-equilibrada com tampão de lise nativa por 1 hr a 4° C) para ligação da etiqueta de histidina ao Ni²⁺. Após ligação (sobrenadante + resina). Após empacotamento da resina, foi realizado uma centrifugação (6000 rpm, 10 min, 4°C) para separação do void e resina, em seguida, foram retirados contaminantes através de lavagens (aproximadamente 40 ml) com tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0). Subsequentemente, as proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0).

A presença de proteína foi acompanhada pela coloração amarelada. Alíquotas de 10 µl de cada fase da purificação (*pellet* do lisado; sobrenadante da ligação com a resina (Void); lavado; e eluato) foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE 10%) com corrente constante de 30 mA.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEÍCA

A concentração das proteínas recombinantes mQSOX1b foram determinadas através da absorbância em 456 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{456 \text{ nm}} = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (HECKLER *et al.*, 2008).

5.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SULFIDRIL OXIDASE

Utilizamos um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX através de uma reação acoplada, onde o peróxido de hidrogênio e a peroxidase de

raiz forte (HRP) oxidam o ácido homovanílico a um produto fluorescente (RAJE *et al.*, 2002).

O ensaio de fluorescência foi realizado pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: $\lambda_{em} = 420nm$, $\lambda_{exc} = 320nm$.

A mistura reacional consistia de ácido homovanílico (HVA) 1mM, ditioneitol (DTT) 0,15 mM, tampão fosfato 50mM, EDTA 0,3mM com pH 7,4. A curva padrão de calibração foi realizada com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,2 μM) com o mix de reagentes já descrito acima.

5.8 CLIVAGEM POR TROMBINA

Após a determinação da atividade de sulfidil oxidase, as recombinantes selvagem e mutada (1mg de cada recombinante) foram incubadas com 10 U trombina (T4648 – Sigma) junto com o tampão PBS 10x, esta incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30,1 hora e 2 horas.

5.9 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação de VSMC foi avaliada pelo método do cristal violeta. Brevemente, VSMC foram plaqueadas em microplacas (5×10^4) em meio completo. Após adesão, as células foram lavadas com PBS 1x e carenciadas com 0,1% SFB por 24 horas. Após este tempo, as células foram estimuladas com 10 % SFB e com diferentes concentrações de QSOX1b recombinantes por 48 horas em meio com 0,1% SFB.

Após 48 horas do estímulo, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com 4% paraformaldeído por 10 min, permeabilizadas com 2% metanol por 10 min e coradas com 0,5% cristal violeta dissolvido em 20% metanol. As células foram lavadas com água, e o corante será extraído com 100 μL de uma solução 1 M de

citrato de sódio pH 4,2 contendo 50% metanol. A absorbância foi determinada em 570 nm no leitor de microplaca Bio-rad modelo 680.

A proliferação também foi avaliada contando-se diretamente o número de células em câmara de Neubauer. Para isso, plaqueamos as células (10^5) em placas de 60 mm. Após adesão foram lavadas com PBS 1x e carenciadas com 0,1 % SFB por 24 horas. Em seguida, incubadas com 50 e 100nM das recombinantes selvagem e na sua forma mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas. O controle negativo continha meio DMEM com 0,1% de SFB e o controle positivo continha meio DMEM com 10% SFB. As placas foram lavadas com PBS 1x e tripsinizadas. As placas foram lavadas com PBS e as células foram desaderidas com tripsina. Em seguida, as células foram centrifugadas à 2.000 rpm por 2 minutos, ressuspensas em 500 µl e contadas em câmara de Neubauer.

5.10 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO COM INIBIDORES FARMACOLÓGICOS

A proliferação de VSMC foi avaliada pelo método do cristal violeta. Brevemente, VSMC foram plaqueadas em microplacas (5×10^4) em meio completo. Após adesão, as células foram lavadas com PBS e carenciadas em meio DMEM (GIBCO) com 0,1% SFB por 24 horas. Após este tempo, as células foram pré-tratadas em meio carenciado com os seguintes inibidores: FTPIII (inibidor da via de Ras) 25µM por 2hs; DPI (inibidor da NADPH oxidase) 20µM por 30 minutos; Peg-Sod (degradar o superóxido intracelular em H_2O_2) 25U/ml por 30 minutos; ou Peg-Cat 200U/ml por 30 minutos. Depois do pré tratamentos as células foram incubadas com QSOX1b 100 mM por 48 horas em meio com 0,1% SFB.

Após 48 horas do estímulo, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com 4% paraformaldeído por 10 min, permeabilizadas com 2% metanol por 10 min e coradas com 0,5% cristal violeta dissolvido em 20% metanol. As células foram lavadas com água, e o corante será extraído com 100 µL de uma solução 1 M de citrato de sódio pH 4,2 contendo 50% metanol. A absorbância foi determinada em 570 nm no leitor de microplaca Bio-rad modelo 680.

5.11 ENSAIO DE FOSFORILAÇÃO

Neste ensaio, usamos células NIH3T3 como controle positivo, uma vez que estas células respondem bem ao estímulo de SFB (MORLA & WANG, 1986). As células (10^5) foram plaqueadas em placas de 60 mm em meio completo. Após adesão, as células foram carenciadas com 0,1% SFB por 24 horas. Após este tempo, as células foram estimuladas com 10% SFB e com 100 nM QSOX1b recombinantes (selvagem e multada) e incubadas por diferentes tempos em meio com 0,1% SFB. Após estes períodos, as células foram lavadas e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM cloreto de sódio, 1% NP40, 0,5% deoxicolato de sódio e 0,1% SDS) contendo inibidores de protease (coquetel da Roche) e inibidores de fosfatase (coquetel fosfatase Sigma, por 30 minutos no gelo, seguido de centrifugação (12000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada por Bradford.

5.12 SDS-PAGE

Para o gel de separação, foi utilizada proporção padrão de 10-15% de acrilamida/bis acrilamida em tampão 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) contendo 0,4% SDS. Agentes catalisadores (persulfato de amônio e N-tetrametil etilenodiamina -TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos. Extratos protéicos (50-80 µg de proteínas) em tampão de amostra redutor (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,2% SDS, 10% glicerol, 0,005% azul de bromofenol e beta mercapto-etanol), na proporção de 1:5 (tampão de amostra: amostra), e em seguida, essas amostras foram fervidas por 5 min a 97°C e aplicados nas canaletas. A separação foi obtida aplicando-se uma corrente constante de 15 mA até a entrada das proteínas no gel de separação, a partir do qual a corrente foi aumentada para 30 mA.

5.13 WESTERN BLOTTING

Após a separação eletroforética, as proteínas foram imobilizadas em membrana de nitrocelulose através de transferência no sistema semi-dry (BioRad) durante 40 minutos sob voltagem constante de 10 V. Para transferência foi utilizado tampão contendo glicina (192 mM), Tris (25 mM), SDS (0,037%) e metanol (20%). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau para verificação da eficiência da transferência, seguida do bloqueio com 5 %BSA ou 5% leite desnatado (Molico) 5% em TBST (dependendo do anticorpo utilizado) por 1 hora.

Foi utilizados os anticorpos primários: monoclonal anti fosfotirosina (P-Tyr-100) da marca Cell Signalling (#9411), fosfotreonina (P-Thr-polyclonal) da marca Cell Signalling (#9381), monoclonal anti fosfoserina da marca Sigma (056k4774) e HA-probe (y-11) (#E1711) da marca Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos foram diluídos em BSA ou leite desnatado 5% em TBST durante 16 horas a 4°C, seguida da incubação com os anticorpos secundários acoplado a HRP, também em solução do bloqueio. Após lavagens com TBST, a membrana foi exposta aos reagentes quimioluminescentes WestPico (Thermo Pierce) e ao filme de auto-radiograma (Thermo Pierce).

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos realizados através de Western blotting tiveram seus resultados analisados através do padrão de bandas obtidos nos testes. Esses testes foram feitos, no mínimo, com um número amostral de 3.

Os valores dos ensaios de proliferação foram expressos em média \pm desvio padrão. Comparações estatísticas foram realizadas com ANOVA, em nível de significância de 0,05, utilizando o software GraphPad Prism v.5.

6. RESULTADOS

6.1 PREPARAÇÃO DAS VSMC E DA RECOMBINANTE QSOX1B

O primeiro passo para iniciarmos os experimentos, foi a obtenção das células musculares lisas da artéria aorta de ratos Wistar. A figura 5 mostra a VSMC migrando do tecido da artéria aorta após o sétimo dia de cultura

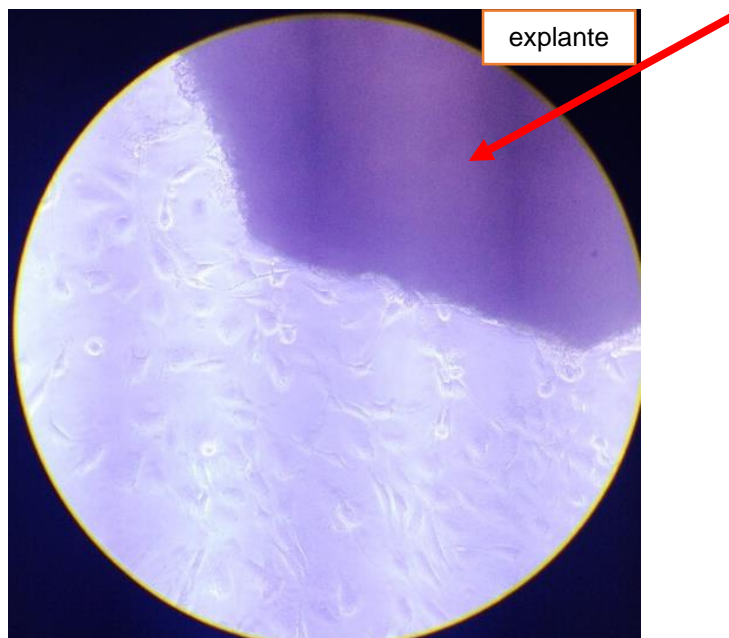


Figura 5 Imagem das células musculares lisas vasculares (VSMC) migrando do tecido da artéria aorta torácica de ratos Wistar.

Imagem do microscópio óptico na objetiva de 10x. Seta: explante do tecido muscular da aorta de rato.

FONTE: autor, 2015.

Antes das células serem utilizadas, foi preciso confirmar a sua identidade celular. Para tanto, foi realizada uma imunofluorescência indireta com anticorpo anti-actina de músculo liso (Figura 6). O resultado obtido mostra em verde, a presença de alfa actina nas células observadas. Os núcleos apresentam-se corados em azul por

DAPI. É possível visualizar esse padrão em aproximadamente 90% das células fixadas, podendo-se excluir a presença de outros tipos celulares, que não VSMC. Portanto, é possível concluir que as células do cultivo primário são VSMC.

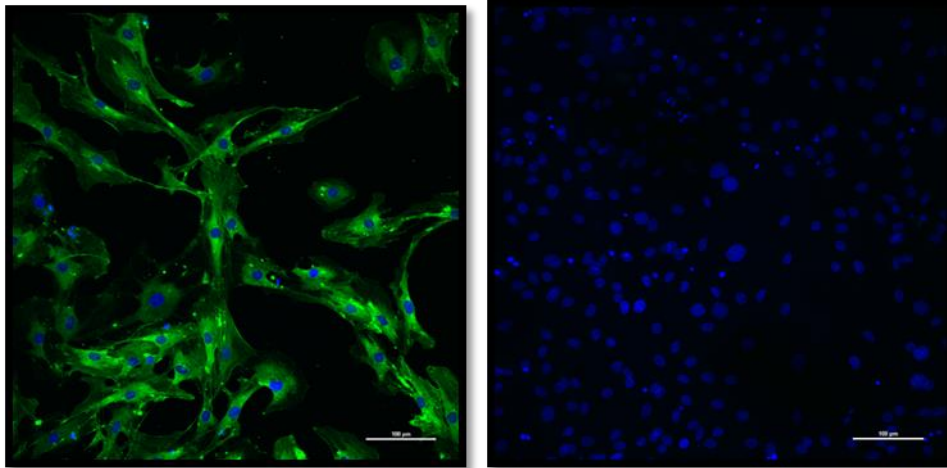


Figura 6 Identificação da VSMC por imunofluorescência.

Confirmação da identidade da VSMC foi realizada pela expressão de actina de músculo liso. O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal anti alfa-actina de músculo liso (Clone 1A4- sigma) 1:250 e o anticorpo secundário utilizado foi anti mouse alexa fluor #488 1:500. A imagem foi captada pelo microscópio de varredura a laser confocal, com a objetiva de 20x. A imagem do lado direito é o controle negativo, em que as células foram incubadas apenas com o anticorpo secundário.

FONTE: autor, 2015.

Após a obtenção da cultura primária, as VSMC foram congeladas no freezer - 80 °C e no nitrogênio líquido. Com as células já identificadas e congeladas, iniciou-se a preparação das recombinantes Qsox1 (selvagem e mutadas). As recombinantes precisam estar recém preparadas para serem utilizadas, pois a recombinante selvagem perde sua atividade ao longo do tempo.

O gene da proteína QSOX1 selvagem foi clonado no vetor vetor pET32-a(+), fusionado a etiquetas histidina e tiorredoxina na região N terminal (figura 7).

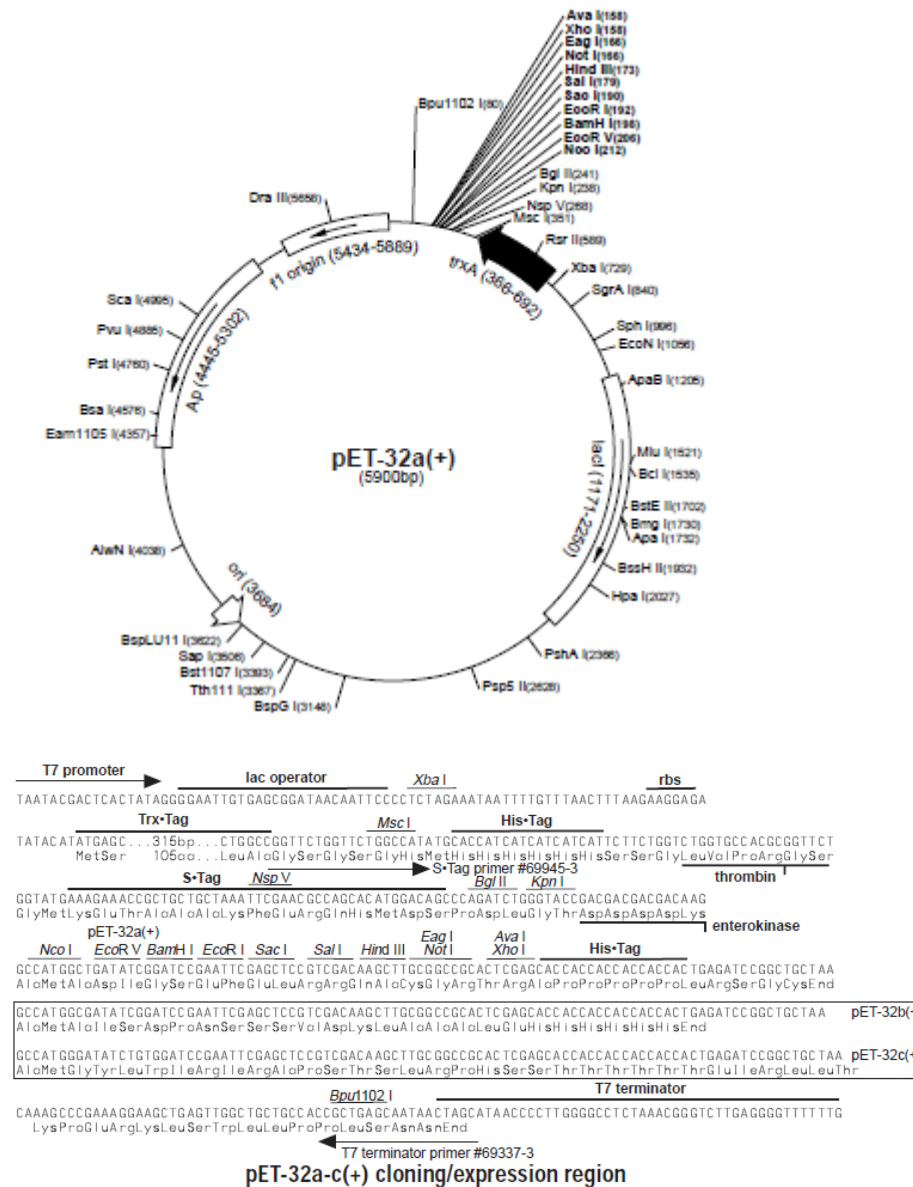


Figura 7 Representação do vetor pET-32a(+) invitrogen.

A parte inferior da figura mostra a sequência de nucleotídeos do vetor, bem como seus sítios de clivagem.

A figura 8, mostra a sequência de aminoácidos da QSOX1b selvagem e mutada clonadas no vetor pET-3a(+) (PORTES *et al.*, 2008; STECLAN *et al.*, 2011). A forma mutante inativada possui um resíduo de serina substituindo a cisteína da posição 452. Por possuir esta mutação, a proteína mutada perde sua atividade sulfidril oxidase. A QSOX1b foi clonada entre os sítios de restrição *KpnI* e *HindIII*.

a) pET-32a(+)-mQSOX WT

MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTYSSSDPLTLLDADSVRPTVLGSSSAWAV
 EFFASWCGHCIAFAPTWKELANDVKDWRPALNLAVLDCAEETNSAVCREFNIAFGPTVRFFQAFTKN
 GSGATLPGAGANVQTLRMRLIDALESHRDTWPPACPPLEPAKLNDIDGFFTRNKADYLALVFEREDSY
 LGREVTLDLSQYHAVAVRRVLNTESDLVNKFGVTDFFPSCYLLLRNGSVSRVPVLVESRSFYTSYLRGL
 PGLTRDAPPTTATPVTADKIAPTWWKFADRSKIYMADLESALHYILRVEVGKFSVLEGQRLVALKKFVA
 VLAKYFPGQPLVQNFLHSINDWLQKQKKRIPYSFFKAALDSRKEDAVLTEKVNWVGCQGSEPHFRG
 FPCSLWVLFHFLTVQANRYSEAHQPQEPADGQEVQAMRSYVQFFFGSRDCADHFEQMAAASMHQV
 RSPSNAILWLWTSHNRVNARLSGALSEDPHFPKVQWPPRELCSACHNELNGQVPLWDLGATLNFLK
 AHFSPANIVIDSS

b) pET-32a(+)-mQSOX-C452S

MHHHHHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDSPDLGTYSSSDPLTLLDADSVRPTVLGSSSAWAV
 EFFASWCGHCIAFAPTWKELANDVKDWRPALNLAVLDCAEETNSAVCREFNIAFGPTVRFFQAFTKN
 GSGATLPGAGANVQTLRMRLIDALESHRDTWPPACPPLEPAKLNDIDGFFTRNKADYLALVFEREDSY
 LGREVTLDLSQYHAVAVRRVLNTESDLVNKFGVTDFFPSCYLLLRNGSVSRVPVLVESRSFYTSYLRGL
 PGLTRDAPPTTATPVTADKIAPTWWKFADRSKIYMADLESALHYILRVEVGKFSVLEGQRLVALKKFVA
 VLAKYFPGQPLVQNFLHSINDWLQKQKKRIPYSFFKAALDSRKEDAVLTEKVNWVGCQGSEPHFRG
 FPCSLWVLFHFLTVQANRYSEAHQPQEPADGQEVQAMRSYVQFFFGSRDCADHFEQMAAASMHQV
 RSPSNAILWLWTSHNRVNARLSGALSEDPHFPKVQWPPRELCSACHNELNGQVPLWDLGATLNFLK
 AHFSPANIVIDSS

Figura 8 Representação da sequência de aminoácidos da proteína QSOX1b selvagem (a) e mutada (b) clonadas no vetor pET-32a(+).

Em amarelo está representado a sequência de aminoácidos da 6His-tag, em verde a sequência de reconhecimento da Trombina, em cinza está a sequência de aminoácidos da proteína QSOX1b e em vermelho está marcado o local da mutação C452S.

A purificação das proteínas foi realizada e os produtos foram analisados a partir de um gel corado com azul de coomassie (figura 9). O resultado mostrou a eficiência da purificação de ambas as proteínas conforme o esperado, pois pode-se visualizar bandas proteicas na altura de 66 kDa.

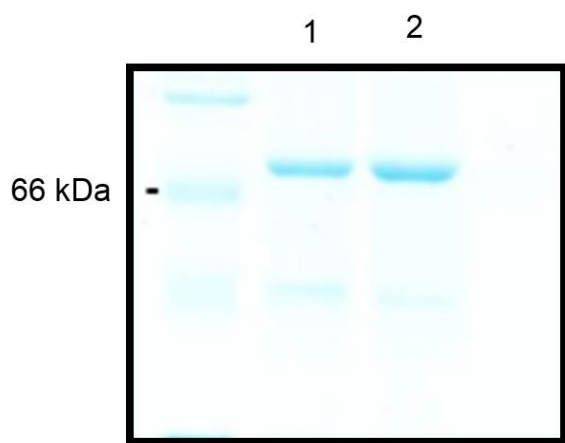


Figura 9 Purificação das QSOX1b recombinantes (selvagem e mutada).

O número 1 representa a proteína QSOX1 selvagem e o 2 QSOX mutada na cisteína C452S.

FONTE: autor, 2015

O próximo passo foi determinar a atividade das enzimas recombinantes. Para isso, utilizamos um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX (RAJE *et al.*, 2002). Ele se baseia na oxidação do ácido homovanílico (HVA) a um dímero fluorescente, pela peroxidase de raiz forte na presença de peróxido de hidrogênio. Como a atividade sulfidril oxidase gera peróxido de hidrogênio, a taxa de formação do dímero fluorescente se relaciona com a taxa de formação do peróxido. Fizemos as reações em microplacas, conforme já descrito (BORGES *et al.*, 2015).

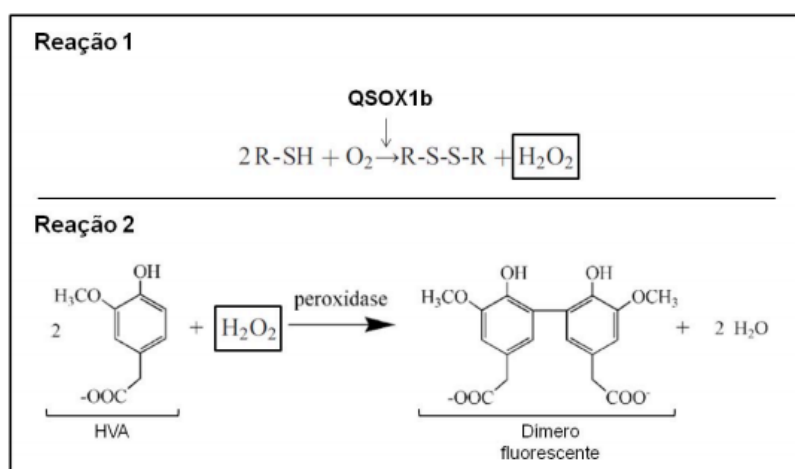


Figura 10 Reações do método indireto de quantificação da atividade quiescina sulfidril oxidase por fluorescência contínua.

FONTE: (RAJE *et al.*, 2002).

A reação 1 mostra a reação enzimática da proteína Qsox1b. Na qual oxida dois grupos sulfidril livre (-SH) a dissulfeto (S-S) reduzindo o O_2 e produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na reação 2, o H_2O_2 gerado pela reação 1 é utilizado como substrato pela peroxidase (HRP) para a dimerização de dois ácidos homovanílico (HVA), resultando em um dímero fluorescente de HVA e água (H_2O).

A figura 11 mostra o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional em relação ao tempo, na recombinante selvagem, mas não na sua forma mutada.

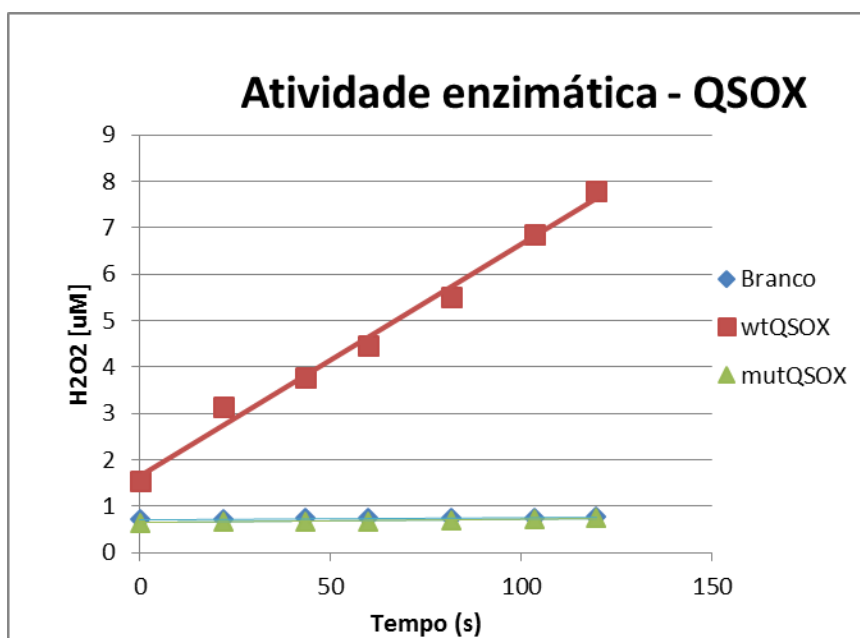


Figura 11 Atividade enzimática das enzimas recombinantes.

Utilizamos um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX (RAJE *et al.*, 2002). Observa-se que a QSOX1 WT produz a H_2O_2 em ao longo do tempo, devido sua atividade enzimática e a QSOX1b mutada não gera H_2O_2 . Branco corresponde ao mix de reagentes sem enzima.

FONTE: autor, 2015.

As recombinantes possuem etiquetas de Trx e 6His, na região N-terminal, que servem para a purificação por afinidade por níquel, respectivamente. Essa etiqueta foi retirada após a purificação para analisar a influência da mesma nos experimentos de proliferação. Para essa remoção as proteínas recombinantes foram incubadas com a enzima trombina (marca), a qual possui um sítio de clivagem entre as

etiquetas e a proteína. Para obtenção de um melhor protocolo, utilizamos a trombina em dois tampões diferentes (PBS e Ca^{2+}). Na figura 12, observamos que no tampão PBS a digestão da QSOX1b ocorreu a partir de 30 minutos e no tampão de Ca^{2+} o mesmo não foi observado.

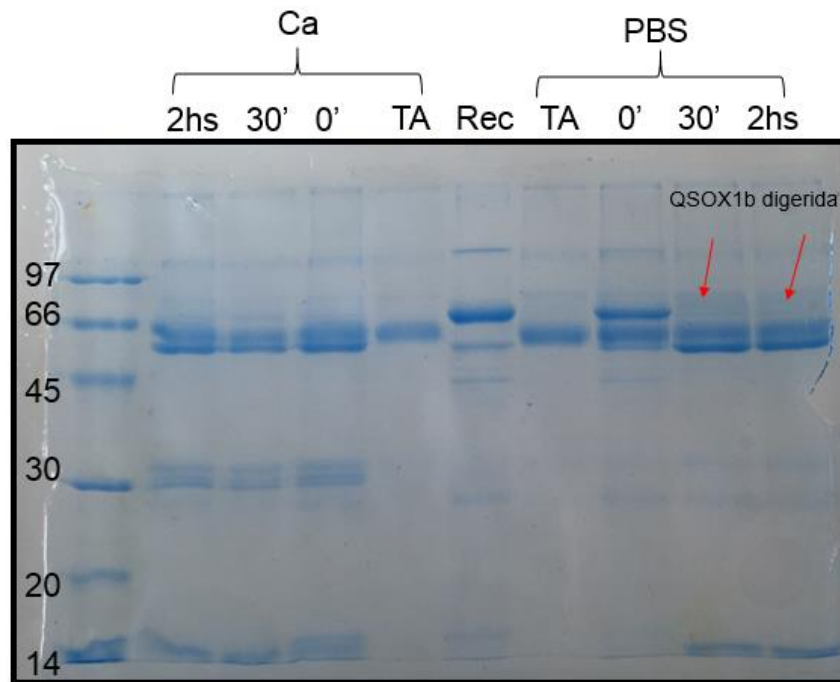


Figura 12 Clivagem da QSOX recombinante por trombina.

A recombinante selvagem após a purificação e com a atividade já medida. Foi incubada por trombina e em dois tampões diferentes (PBS e Ca^{+}) em diferentes tempos (0, 30 minutos e 2 horas). Após os determinados tempos de incubação, corremos um gel e coramos com comassie. A Rec é a recombinante Qsox1b selvagem e o TA são apenas os tampões.

FONTE: autor, 2015.

6.2 EFEITO DA QSOX1B NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC

Para confirmar dados anteriores do nosso laboratório, os quais mostraram que a QSOX1b extracelular induz proliferação de VSMC, foi utilizado o método de cristal violeta, como sendo um método viável para proliferação celular, na qual o corante cora os núcleos das células. Observamos na figura 13 que tanto a QSOX1b

(selvagem) quanto a mutada provocaram um aumento estatisticamente significativo na proliferação de VSMC em relação ao controle sem QSOX1b. Também observamos diferença significativa em relação a concentração de 50 e 100nm com ambas recombinantes. Nota-se que, na concentração de 50nM de QSOX1b a proliferação de VSMC só é observada de forma significativa quando utilizada a QSOX1b mutada.

De modo geral, este aumento na proliferação de VSMC apresentou-se de forma dose-dependente para ambas as recombinantes, mas não dependente da atividade sulfidril oxidase, pois a QSOX1 mutada também foi efetiva em induzir a proliferação em comparação com o controle negativo.

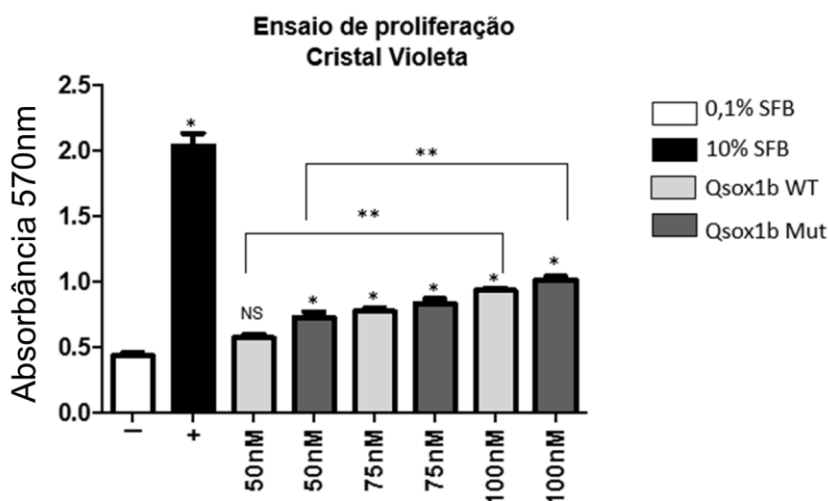


Figura 13 Efeito na proliferação de VSMC pelo ensaio de cristal violeta.

VSMC foram incubadas com 50, 75 e 100nM da QSOX1b selvagem ou mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB e o controle positivo tinha células com o meio DMEM mais 10% SFB. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (sem QSOX1); NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

O efeito proliferativo da recombinante QSOX1b exógena sobre a VSMC foi avaliado também pela contagem de células em câmara de Neubauer.

Foi observado um efeito proliferativo das recombinantes na VSMC, confirmando mais uma vez o efeito pró-proliferativo das recombinantes Qsox1b.

Como observado no ensaio de cristal violeta, a recombinante selvagem (50nM) não induziu significativamente a proliferação celular (figura 14).

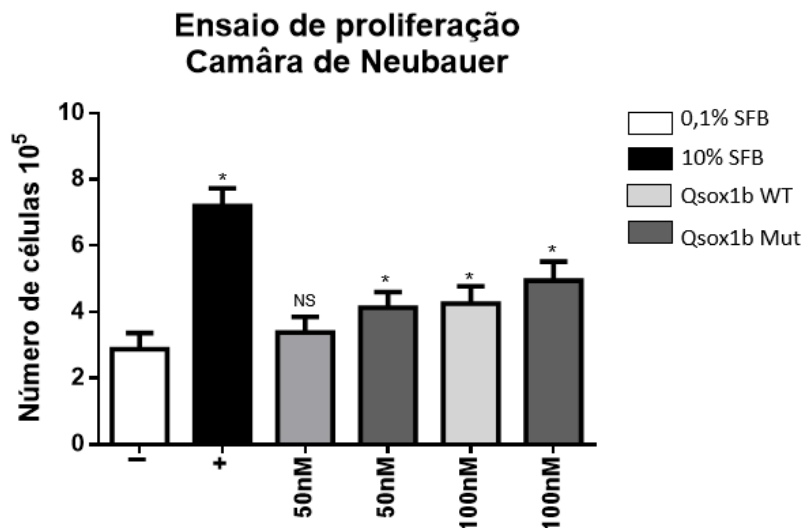


Figura 14 Efeito da QSOX1b na proliferação de VSMC por contagem direta.

VSMC foram incubadas com 50 e 100nM da QSOX1b selvagem ou mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB e o controle positivo tinha células com o meio DMEM mais 10% SFB. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (sem QSOX1); NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

Para excluir a participação do tag Trx no efeito proliferativo, testamos também QSOX1 secretada de células HEK293 superexpressando QSOX1-HA. As VSMCs foram incubadas com o sobrenadante de 48 h das células HEK transfectadas com o plasmídeo Qsox1b-HA WT e mut. Após 48h de incubação com as VSMC, foi realizado o ensaio de cristal violeta. A figura 15 mostra que a Qsox1b secretada por uma célula eucariótica também induz um aumento na proliferação celular de VSMC de forma significativa. O resultado mostrou também que a indução da proliferação independe da atividade enzimática, da QSOX1.

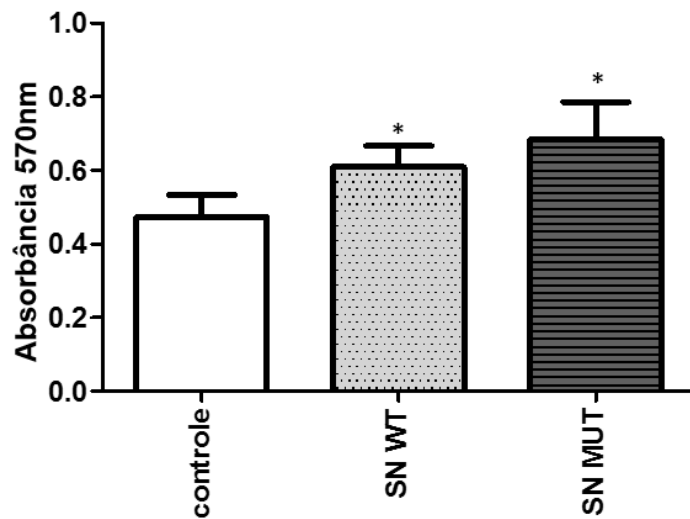


Figura 15 Efeito da QSOX1b superexpressa por célula eucariótica em VSMC.

Foi utilizado o sobrenadante das células transfectada com a Qsox1b-HA secretada e incubado em VSMC por 48hs. O resultado corresponde a 4 ensaios independentes. Estatisticamente significativo quando * $p < 0,05$.

FONTE: autor, 2015.

Para confirmar que as HEK 293T estavam superexpressando as QSOX1 selvagem e mutada, analisamos a expressão proteica nos lisados celulares e nos sobrenadantes após 48 h da transfecção. O resultado mostrou a presença de proteínas com tag HA nos sobrenadantes de ambas células. O anticorpo HA somente detectou bandas no extrato correspondente às células transfectadas com Qsox1b-HA Mut. O GFP foi utilizado como um controle positivo para transfecção, através da emissão de fluorescência; bem como um controle negativo para o western blot (figura 16).

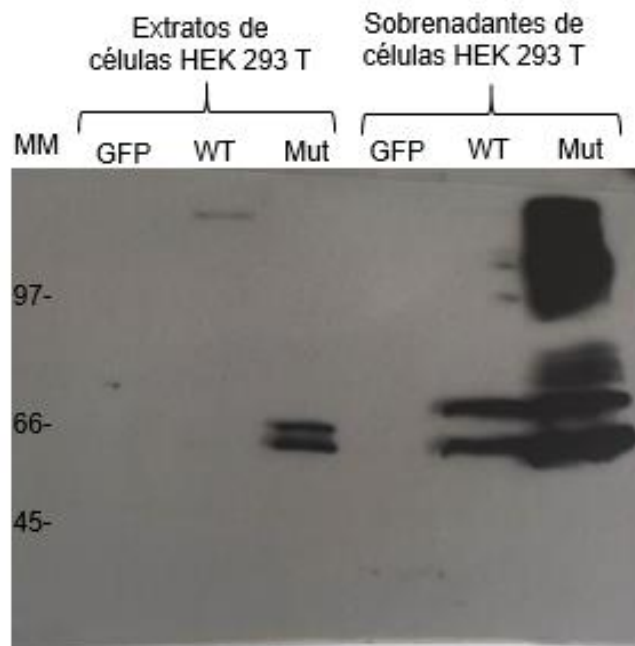


Figura 16 Confirmação da transfeção de Qsox1b-HA em células HEK 293.

O lisado e o sobrenadantes de células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo da Qsox1b-HA selvagem e mutada. Foi realizado western blot com anticorpo HA (1:500).

FONTE: autor, 2015.

7.3 SINALIZAÇÃO REDOX ENVOLVIDA NA PROLIFERAÇÃO DE VCMC INDUZIDA PELO QSOX1B

Após a confirmação de que a QSOX1b extracelular induz a proliferação de VSMC, nosso próximo objetivo foi utilizar alguns inibidores de vias de proliferação para tentar compreender com mais detalhes o processo de proliferação da VSMC induzida pela QSOX1b.

Para analisar se a sinalização redox também estaria associada com a proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b, analisamos a via de NADPH oxidase, que é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio.

Para tanto, utilizamos o Difenilenoiodonio (DPI), que é um inibidor da via NADPH oxidase, a fim de analisar a influência dos produtos dessa via na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.

O pré tratamento com 20 μ M DPI por 30 minutos, seguido da incubação com 100 nM das proteínas recombinantes levou a uma diminuição na proliferação celular das células tratadas com DPI em relação as não tratadas. Estes dados mostram que os produtos da via NADPH oxidase podem estar envolvidos na proliferação celular induzida pela Qsox1b (figura 17).

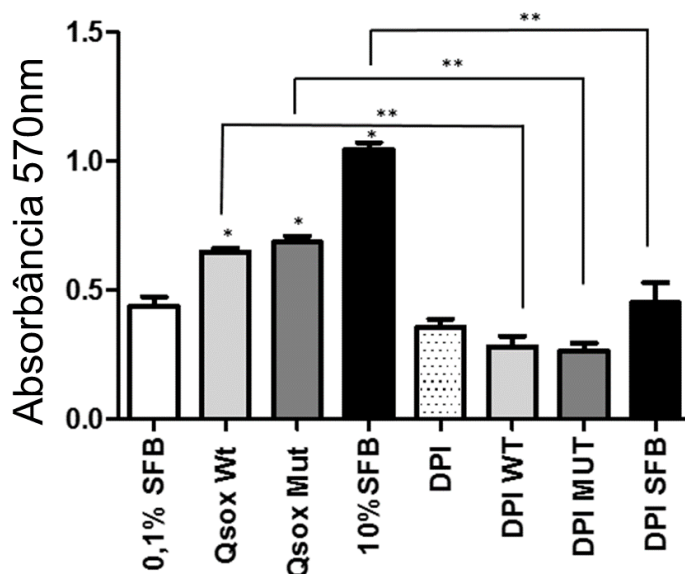


Figura 17 Efeito da NADPH oxidase na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.

Para avaliar se a via de NADPH oxidase estava envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b extracelular. Foram plaqueadas 10⁵ células, em seguida carênciadas com 0,1% SFB por 24 horas e incubadas com meio DMEM 10% SFB e com 100nM das recombinantes selvagem e na sua forma mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas, foram pré incubadas ou não pela DPI 20 μ M por 30min. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB. Após 48hs de tratamento, foi realizado o ensaio de cristal de violeta e medido absorbância. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

Utilizamos outras enzimas, a Peg-superóxido dismutase (SOD) que decompõe o superóxido para peróxido hidrogênio e a enzima Peg-catalase que degrada peróxido de hidrogênio em H₂O e O₂. Com isso, analisamos a participação do superóxido e do peróxido de hidrogênio na proliferação celular induzida pela Qsox1b. Dados da literatura apontam que poucas quantidades dessas espécies reativas de oxigênio podem levar a um aumento de proliferação celular (GOUGH & COTTER, 2011).

A figura 18 mostra que não houve diferença significativa entre as células tratadas com Peg-Cat e as não tratadas, mostrando que H_2O_2 não está envolvido na proliferação de VSMC induzido pela Qsox1b. Estes resultados confirmam dados prévios publicado pelo nosso grupo. (Borges et al., 2015)

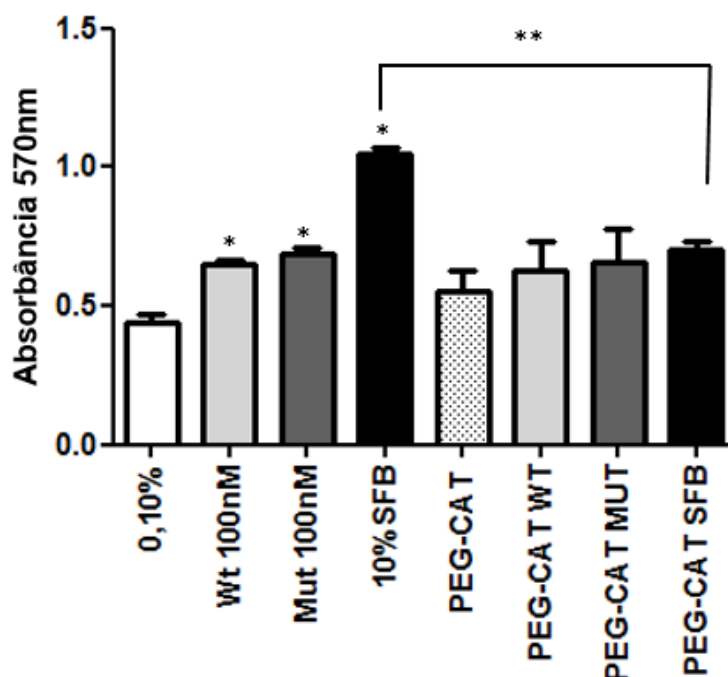


Figura 18 Efeito da Peg-Cat na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.

Foram plaqueadas 10^5 células, em seguida carênciadas com 0,1% SFB por 24 horas e incubadas com meio DMEM 10% SFB e com 100nM das recombinantes selvagem e na sua forma mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas, foram pré incubadas ou não pela Peg-Cat (200U/ml) por 30min. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB. Após 48hs de tratamento, foi realizado o ensaio de cristal de violeta e medido absorbância. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

Visto que a NADPH oxidase está envolvida na proliferação celular de VSMC induzida pela QSOX1b, supomos então, que algum produto de espécies reativas de oxigênio estaria envolvida na proliferação de VSMC. Portanto, utilizamos o

polietileno glicol superóxido dismutase (Peg-Sod), que é capaz de degradar o superóxido intracelular em H_2O_2 , que é menos reativo.

A figura 19 mostra que quando pré-tratamos as células com Peg-Sod, seguido da incubação com as recombinantes QSOX1b (selvagem e mutada), houve uma diminuição da proliferação celular em relação as células não tratadas com Peg-Sod. Esses resultados indicam que a proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b envolve a ativação da via de superóxido.

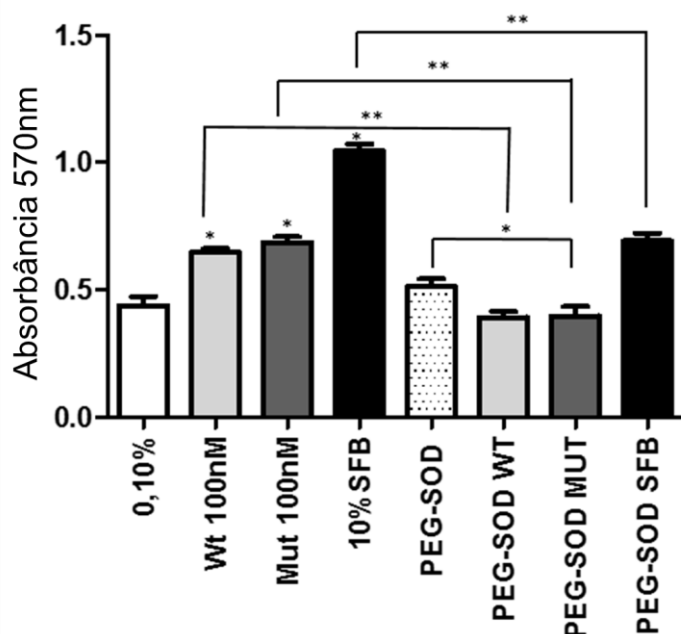


Figura 19 Efeito do Peg-Sod na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.

Foram plaqueadas 10^5 células, em seguida carênciadas com 0,1% SFB por 24 horas e incubadas com meio DMEM 10% SFB e com 100nM das recombinantes selvagem e na sua forma mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas, foram pré incubadas ou não pela Peg-Sod (25U/ml) por 30min. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB. Após 48hs de tratamento, foi realizado o ensaio de cristal de violeta e medido absorbância. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

6.4 ATIVAÇÃO MITOGÊNICA DA VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B

Visto que, a indução da proliferação de VSMC por QSOX1b ocorre sem a participação da atividade sulfidril oxidase, possivelmente um domínio da proteína

está funcionando como um ligante para ativação de receptores de membrana. Este domínio deve ser ativado, levando a ativação da via de Ras e desencadeando uma cascata mitogênica de fosforilação de proteínas.

A via de Ras é bastante estudada e conhecida pela ativação da proliferação celular. Portanto, avaliamos se essa via estaria envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b, utilizando FPTIII, que é um inibidor desta via.

A figura 20 mostra que quando pré-tratamos as células com 25 μ M de FPTIII seguido da incubação com as recombinantes QSOX1b (selvagem e mutada), houve uma diminuição significativa da proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b. Observamos, assim, que a via de Ras pode estar envolvida nesse processo.

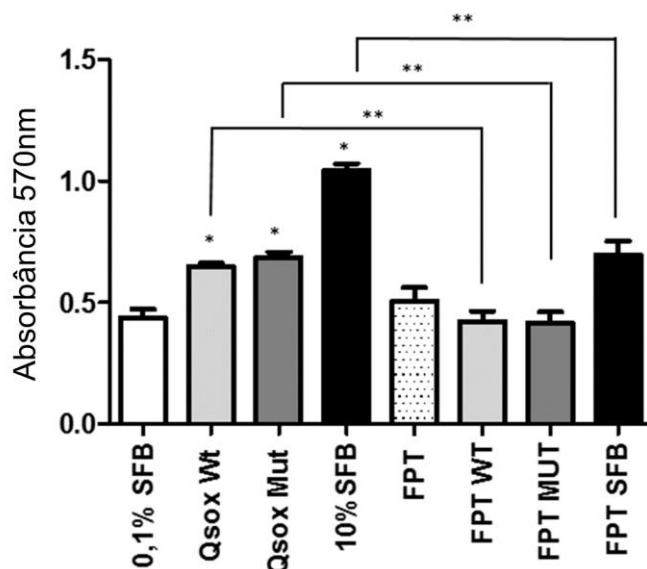


Figura 20 A via de Ras envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b.

Para avaliar se a via de Ras está envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b extracelular, foram plaqueadas 10^5 células, em seguida carênciadas com 0,1% SFB por 24 horas e incubadas com meio DMEM 10% SFB e com 100nM das recombinantes selvagem e na sua forma mutada em meio DMEM com 0,1% SFB por 48 horas, foram pré incubadas ou não pela FPTIII 25uM por 2 horas. O controle negativo apenas tinha células e o meio DMEM com 0,1% de SFB. Após 48hs de tratamento, foi realizado o ensaio de cristal de violeta e medido absorbância. O resultado corresponde a 3 ensaios independentes. * $p < 0,05$; NS, não significativo.

FONTE: autor, 2015.

Nosso próximo objetivo foi estudar a fosforilação de tirosinas estimulada pela QSOX1b. Como controle positivo do anticorpo, foram utilizadas células 3T3, uma vez que estas células respondem bem ao estímulo de SFB e seu efeito mitogênico é

disparado pela fosforilação de tirosina segundo Morla, (1986). Sendo assim, nossos resultados experimentais mostraram que o SFB induz a fosforilação nas células 3T3, estando de acordo com Morla (Figura 21).

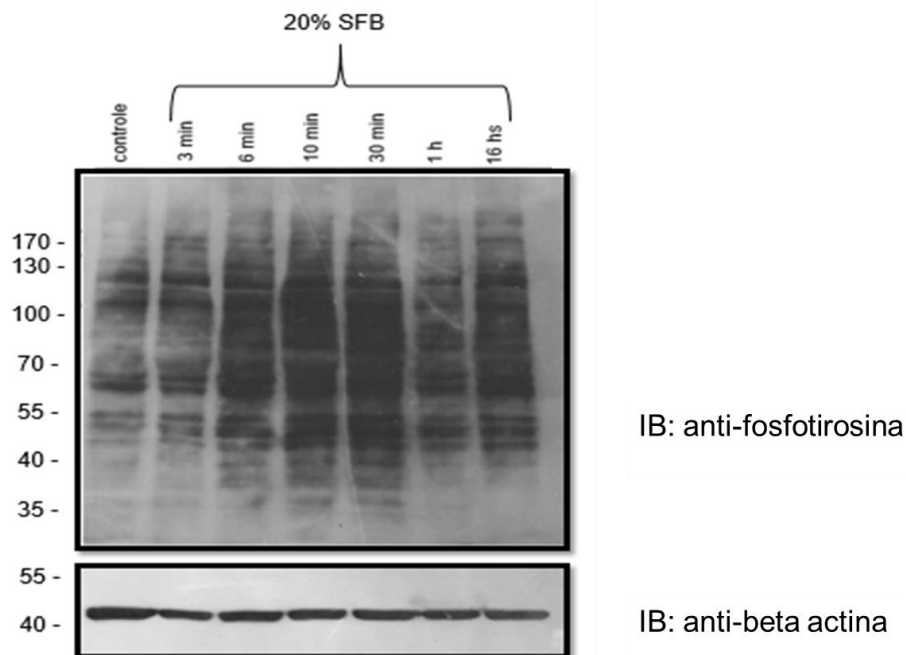


Figura 21 Western Blotting com anti fosfotirosina em células 3T3.

As células 3T3 foram carenciadas com 0,5%. O controle foi a células 3T3 sem o estímulo do SFB apenas no meio de carenciamento. O restante foi estimulado com 20% de SFB em vários tempos (3 min, 6 min, 10 min, 30 min, 1 hora e 16 horas). Foi utilizada como normalizador o anti beta actina.

FONTE: autor, 2015.

Para avaliar se o mesmo efeito ocorreria em células de aorta de rato, as VSMC foram carenciadas com 0,5% de SFB por 48 horas, e após esse tempo, estimuladas com 20% SFB por diferentes tempos. Foi realizado um western blot com o anticorpo anti fosfotirosina. Esse resultado mostra que o SFB estimula a fosforilação de tirosina a partir de 6 minutos, tendo seu maior pico entre 10 a 30 minutos e depois começa a diminuir. Confirmada a ação do SFB sobre a fosforilação de VSMC, esta condição passou a ser utilizada como controle positivo para o

experimento seguinte, que testou o efeito da QSOX1b na fosforilação de VSMC (Figura 22).

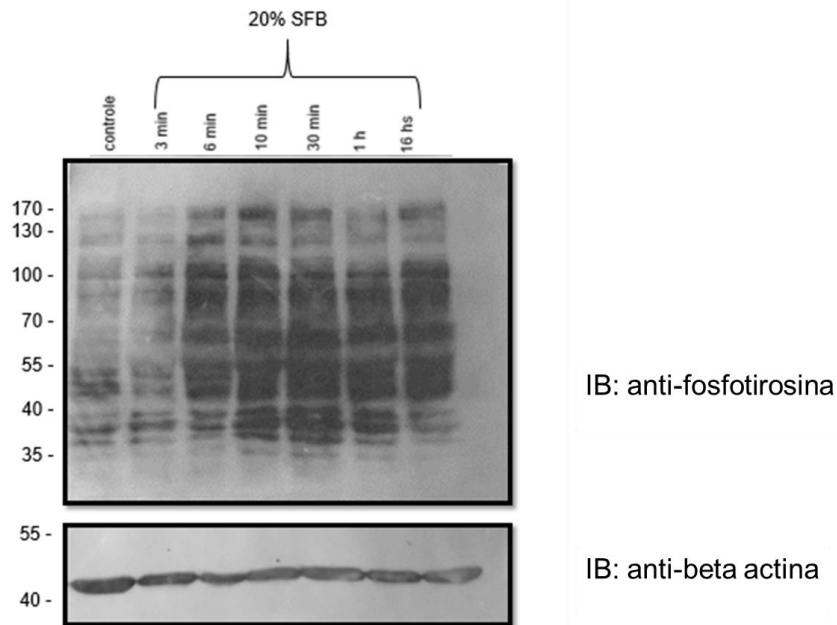


Figura 22 Western Blotting com anti fosfotirosina em VSMC.

As VSMC foram carenciadas com 0,5% SFB; O controle foi a VSMC sem o estímulo do SFB apenas no meio de carenciamento. O restante foi estimulado com 20% de SFB em vários tempos (3 min, 6 min, 10 min, 30 min, 1 hora e 16 horas). Foi utilizada como normalizador o anti beta actina.

FONTE: autor, 2015.

Na figura 25, as VSMC foram carenciadas com 0,1% de SBF por 48 horas, e após esse tempo, incubadas com Qsox1b selvagem ou na sua forma mutada ambas com a concentração de 100nM por 10 e 30 minutos. Esses tempos foram escolhidos com base em experimentos anteriores que mostraram em que momento de maior pico de fosforilação de tirosina era obtido (figuras 23 e 24).

Como esperado, o resultado mostra que em relação ao controle negativo, que não sofreu nenhum estímulo, tanto QSOX1b selvagem quanto a mutada provocaram aumento de fosforilação de resíduos de tirosina em VSMC. Porém, esse aumento foi menor do que o provocado por SFB, que usamos como controle positivo. Na figura

25, esta mesma membrana foi incubada com anti-beta actina, usado como forma de normalização.

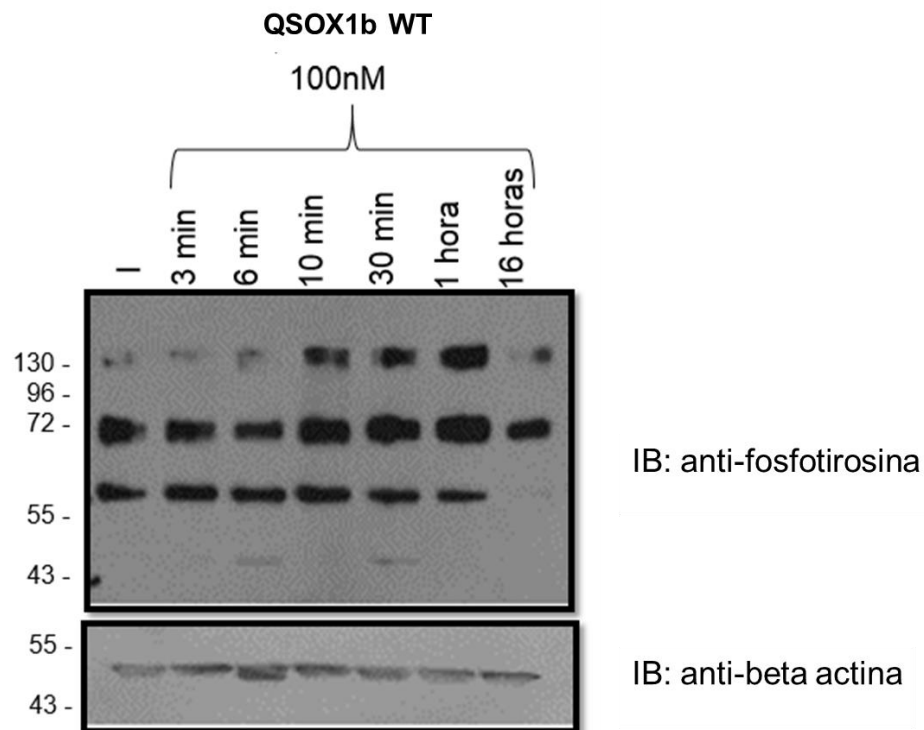


Figura 23 Efeito do estímulo da Qsox1b WT em VSMC na fosforilação de resíduos de tirosina em vários tempos.

As células foram acenciadas com 0,1% SFB por 24 horas e em seguida, foram incubadas com 100nM de Qsox1b selvagem em diferentes tempos, 3min, 6min, 10min, 30 min, 1 hora e 24hs. O controle negativo, as células se manteve em careciamento, sem algum estímulo.

FONTE: autor, 2015.

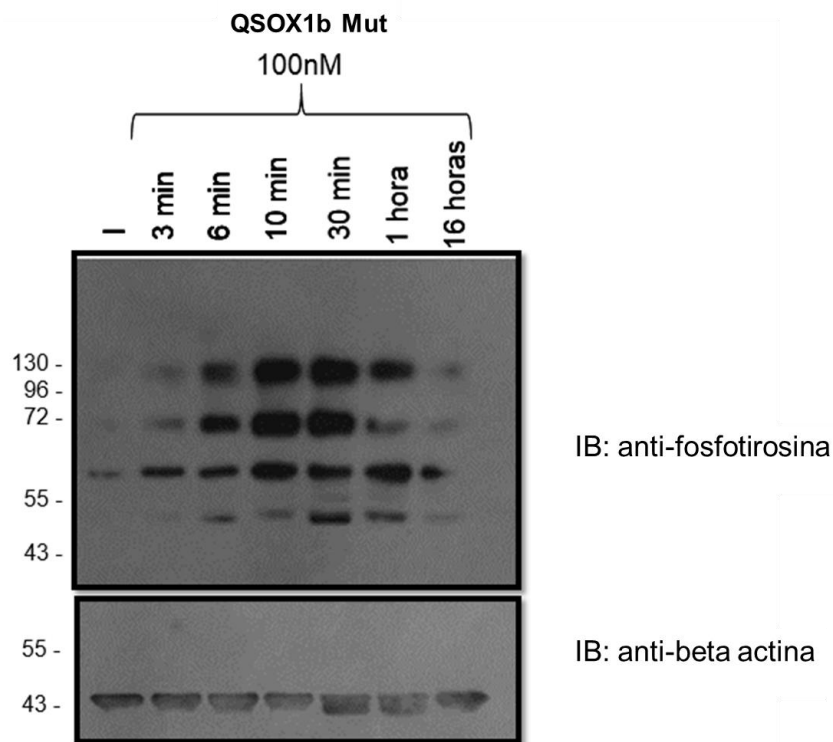


Figura 24 Efeito do estímulo da Qsox1b Mut em VSMC na fosforilação de resíduos de tirosina em vários tempos.

As células foram acenciadas com 0,1% SFB por 24 horas e em seguida, foram incubadas com 100nM de Qsox1b Mutada em diferentes tempos, 3min, 6min, 10min, 30 min, 1 hora e 24hs. O controle negativo, as células se manteve em careciamento, sem algum estímulo.

FONTE: autor, 2015.

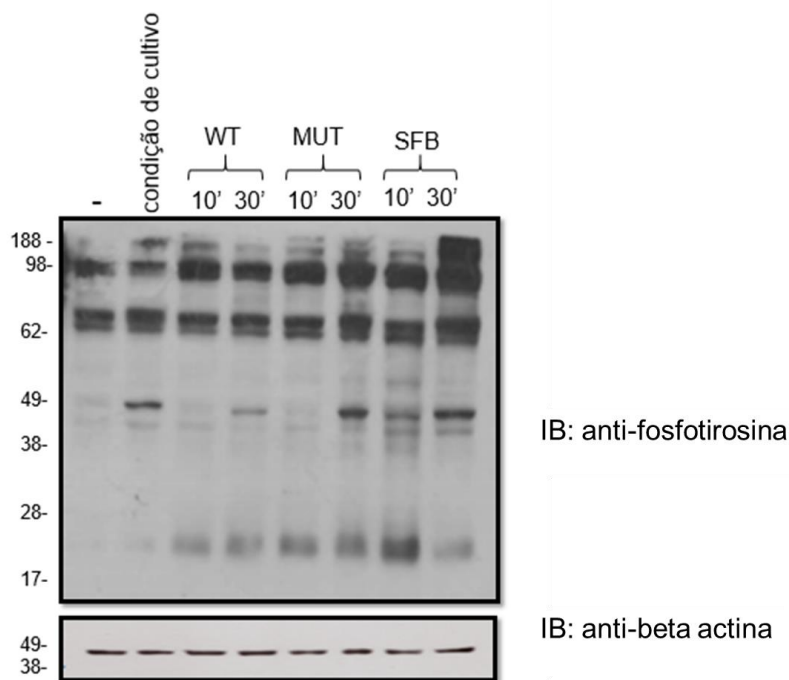


Figura 25 Efeito da fosfotirosina em VSMC induzida pela QSOX1b.

As células foram acenciadas com 0,1% SFB por 24 horas em seguida foram incubadas por a vários estímulos (Qsox1b WT, Qsox1b Mut e por 20% SFB) por 10 e 30 minutos. ● controle negativo são as VSMC com meio DMEM e 0,1% SFB, não estimulada.

FONTE: autor, 2015.

A partir do momento que observamos que a QSOX1b induziu a fosforilação de resíduos de tirosinas em VSMC, decidimos investigar se o mesmo efeito ocorreria com resíduos de treonina.

Na figura 26, podemos observar que a QSOX1b também foi capaz de promover um aumento na fosforilação de resíduos de treonina. Esta fosforilação foi melhor observada no tempo de 30 minutos para QSOX1b selvagem e 10 minutos para proteína mutada.

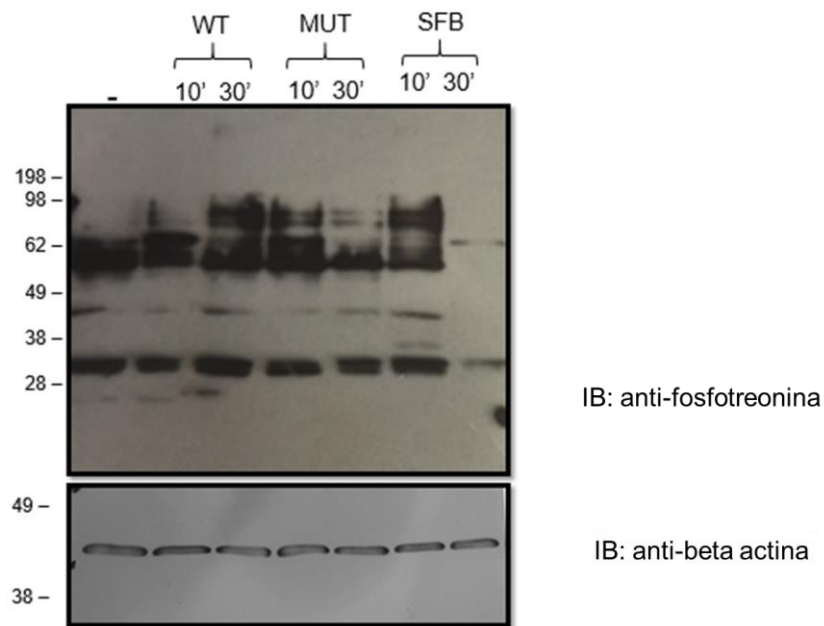


Figura 26 Efeito da fosfotreonina em VSMC induzida pela QSOX1b.

As células foram acenciadas com 0,1% SFB por 24 horas em seguida foram incubadas por a vários estímulos (Qsox1b WT, Qsox1b Mut e por 20% SFB) por 10 e 30 minutos. O controle negativo são as VSMC com meio DMEM e 0,1% SFB, não estimulada.

FONTE: autor, 2015.

Houve ainda, uma tentativa de observar fosforilação de resíduos de serina provocada pela QSOX1b, porém o anticorpo não foi eficiente.

Como futuras análises a fim de identificar quais proteínas diferentemente fosforiladas após os estímulos com a QSOX1b, será realizado o fosfoproteoma por espectrometria de massa. A partir do resultados de fosfotirosina e treonina, escolhemos o tempo de 30 minutos da mQSOX1b para realizar o fosfoproteoma, sendo o tempo de maior grau de fosforilação de VSMC.

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho, confirmamos que as QSOX1b recombinantes selvagem e mutada induzem a proliferação de VSMC. Esses achados foram determinados através de ensaios de cristal violeta.

Na figura 13 é mostrado que ambas as recombinantes (selvagem e mutada) induziram um aumento significativo na proliferação celular em VSMC em relação ao controle negativo, o qual não possuía nenhum estímulo. Foi também observado uma diferença significativa dependente da concentração da Qsox1b, pois a proliferação aumentou conforme o aumento da concentração de 50nM e 100nM da Qsox1b.

Estes dados foram corroborados pela contagem direta de células. Na figura 14 foi observado mais uma vez que a Qsox1b tanto na sua forma selvagem como a mutada induziram a proliferação celular de forma significativa. Sendo assim, mostramos a eficácia dos dois tipos de métodos utilizados: cristal violeta e a contagem direta pela câmara de Neubauer, pois ambos apresentaram resultados de proliferação similares.

Concordando com os dados de Borges et al. (2015), podemos observar que realmente a proteína QSOX1 participa do processo de proliferação celular de células musculares lisas, sendo dependente da concentração, pois com 100nM de recombinante a proliferação é maior. Interessantemente esta proliferação independente da atividade sulfidril oxidase, pois podemos perceber que não tem diferença entre a recombinante selvagem e a mutada na mesma concentração.

Até então havíamos utilizado nos experimentos a proteína recombinante QSOX1b. A fim de estudar o processamento da QSOX1b numa célula eucariótica, transfectamos o plasmídeo QSOX1b-HA em células HEK293T. Após a incubação do sobrenadante das células transfectadas sobre VSMC foi observado aumento da proliferação celular. Esses dados mostraram que a ação da proteína secretada foi similar a da proteína recombinante purificada, mostrando que a QSOX1b no meio extracelular é capaz de disparar um evento mitogênico nas VSMC. E interessante, a atividade enzimática não teve papel neste processo (figura 15).

A figura 16 somente ilustra, através do método western blot, que QSOX-HA estava presente no sobrenadante das células HEK293T.

Como citado na introdução desse trabalho, a QSOX1b possui um domínio ALR na sua estrutura. Wang et al., (1999) mostrou que a proteína ALR/HPO que também possui atividade sulfidril oxidase provoca um aumento na proliferação de hepatócitos. Chen et al. (2003), mostrou que a essa mesma proteína selvagem e mutada (forma inativa da atividade sulfidril oxidase) estimula a proliferação celular em HepG2. Como a Qsox1b possui o mesmo domínio ALR, é possível que a mesma esteja agindo da mesma forma em VSMC.

Nossos resultados de proliferação estão em desacordo com o Coppock et al (2000), que mostrou que a expressão de QSOX1b está associada a quiescência celular.

Polimeno et al. (2012), investigou o efeito do silenciamento do gene GFER (gene que codifica a enzima sulfidril oxidase ALR) associando com os níveis específicos de ROS pelo do método de diclorofluoresceína (DCF-DA). Este estudo mostrou o efeito benéfico da recombinante ALR no estado redox celular das células de glioma derivado de humanos (T98G) (POLIMENO *et al.*, 2012). Recentemente, a Qsox1b também tem sido associada a proteção da tumorigenese. No estudo (PERNODET *et al.*, 2012) mostrou que a QSOX1 reduz a proliferação, migração e invasão de tumor de mama e a expressão Qsox1 protege a contra morte celular induzida por estresse oxidativo (MOREL *et al.*, 2007). Nossos resultados de proliferação em VSMC não corroboram os dados desses autores, porém a QSOX1b pode agir de modo diferentes nos variados tipos celulares.

A Qsox1b possui atividade sulfidril oxidase na qual seu produto final é um ROS (H_2O_2). A NADPH oxidase é a principal fonte geradora de ROS, que podem atuar como mensageiros para sinalização redox (BEDARD & KRAUSE, 2007). Empregando inibidores farmacológicos, conseguimos demonstrar que a NADPH oxidase deve participar da sinalização induzida pela QSOX1b extracelular. Assim, foi possível avaliar os eventos intracelulares provocados pela QSOX1b em VSMC.

Primeiramente, decidimos utilizar um inibidor da NADPH oxidase (o DPI) para verificar se os ROS gerados estavam associados com a proliferação celular induzida pela Qsox1b.

Na figura 17 mostramos que quando inibimos a via NADPH oxidase tivemos uma diminuição da proliferação celular. Esse dado mostrou que essa via redox pode estar influenciando o processo proliferativo da VSMC induzido pela QSOX1b. (PESCATORE *et al.*, 2012), mostrou que os produtos da NADPH oxidase também estavam envolvidos com a VSMC no processo de migração celular induzido pela Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI). Como já mencionamos, esta proteína coopera junto com a QSOX1 durante o dobramento oxidativo e isomerização de proteínas (RANCY & THORPE, 2008) e regula a atividade da NADPH oxidase vascular (JANISZEWSKI *et al.*, 2005).

Nas figuras 18 e 19 utilizamos enzimas de inibição da produção de H_2O_2 e de O_2 para analisar qual desses ROS estaria envolvido no processo de proliferação celular. Primeiramente, utilizamos Peg-Cat, que depleta H_2O_2 intracelular. A figura 18 mostrou que não houve diferença significativa entre as células tratadas e não tratadas com a Peg-Cat. Portanto, o H_2O_2 não estaria envolvido com o processo de proliferação celular induzido pela Qsox1b, corroborando os dados Borges, *et. al.* (2015), que também analisou o efeito de Peg-Cat no processo de proliferação de VSMC induzido pela Qsox1b e observou que não houve alteração.

Como visto que o H_2O_2 não estava envolvido no processo de proliferação celular de VSMC, fomos investigar outra espécie reativa de O_2 , o superóxido. Já que inibindo a NADPH oxidase tem-se uma diminuição da proliferação celular de VSMC induzida pela Qsox1b. Utilizamos Peg-Sod, que depleta superóxido intracelular. Na figura 19, mostramos que quando utilizamos Peg-Sod em VSMC tratadas com QSOX1b ocorre uma diminuição da proliferação destas células em relação as que não foram tratadas com Peg-Sod.

Assim, parece que a via redox envolvida no processo de proliferação celular de VSMC induzida pela QSOX1b é pelo superóxido e não pelo H_2O_2 . Com relação à migração de VSMC induzida pela QSOX1b, Borges *et. al.* (2015) mostrou que a via envolvida é a do H_2O_2 . Com esse resultado poderíamos inferir que as vias de proliferação e migração ativadas pela QSOX1b em VSMC ocorre de forma distinta.

Como já mencionado na introdução, sabe-se que o domínio ALR funciona como um sinalizador para ativar a via de MAP quinase no fígado (LI *et al.*, 2000). Dessa maneira, a nossa hipótese é que possivelmente esse domínio de QSOX1 seja um ligante para ativação, por exemplo, de receptor de tirosina quinase. Esse

receptor quando ativado, ativa a via de Ras e inicia uma cascata de sinalização com fosforilação de diversas proteínas que levam à proliferação celular.

Para analisar se a via de Ras estaria envolvida na proliferação de VSMC induzida pela QSOX1b, pré-tratamos as células com FPT III (inibidor da via de Ras). Posteriormente, as células foram incubadas com a QSOX1b. Na figura 20, mostramos que quando tratamos as células com FPTIII ocorreu uma diminuição no número VSMC em relação as não tratadas com este inibidor. Isto mostra que a via de Ras parece estar sendo ativada, dando início a uma cascata de sinalização e levando a proliferação celular. Corroborando nosso resultado, o grupo do Hugo Monteiro (2015), demonstrou o envolvimento da via de Ras com a migração de células endoteliais, utilizando o inibidor desta via (FPT II) (ELLER-BORGES *et al.*, 2015).

Visto que a via de Ras é ativada o próximo passo foi estudar se haveria a posterior fosforilação de proteínas com resíduos de tirosinas, treoninas e serinas .

Como controle positivo utilizamos o soro fetal bovino como indutor de fosforilação em VSMC. Na figura 22, obtivemos os mesmos resultados que (MORLA & WANG, 1986), que mostraram que o SFB induz a fosforilação nas células NIH 3T3.

Nas figuras 23, 24 e 25, observamos que o estímulo da QSOX1b aumenta a fosforilação de proteínas-chave em resíduos de tirosina. O pico máximo de fosforilação é de 10 a 30 minutos de estímulo da proteína QSOX1b. Na figura 26, o mesmo aconteceu com proteínas com resíduos de treonina, mostrando que a QSOX1 é capaz de disparar uma cascata de fosforilação intracelular.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível confirmar que a QSOX1b extracelular induz a positivamente a proliferação de VSMC, de forma dependente da concentração da enzima e independente da atividade enzimática da mesma.

Através de inibidores farmacológicos da formação de ROS, mostramos que a via de superóxido está envolvida no processo de proliferação induzida pela QSOX1b, bem como a via de sinalização Ras.

Os nossos dados indicam que o mecanismo envolvido no efeito mitogênico da QSOX1b extracelular em VSMC parece estar ativando a via de fosforilação de tirosinas e treoninas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALON, A., *et al.* The dynamic disulphide relay of quiescin sulphydryl oxidase. **Nature**, v. 488. n. 7411, p. 414-418, 2012.
- ALON, A., *et al.* QSOX contains a pseudo-dimer of functional and degenerate sulphydryl oxidase domains. **Febs Letters**, v. 584. n. 8, p. 1521-1525, 2010.
- ARAUJO, D. G., *et al.* Expression level of quiescin sulphydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. **European journal of histochemistry : EJH**, v. 58. n. 1, p. 2228, 2014.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87. n. 1, p. 245-313, 2007.
- BENAYOUN, B., *et al.* Rat seminal vesicle FAD-dependent sulphydryl oxidase - Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulphydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276. n. 17, p. 13830-13837, 2001.
- BORGES, B. E., *et al.* The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1852. n. 7, p. 1334-1346, 2015.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular research**, v. 68. n. 1, p. 26-36, 2005.
- CHAKRAVARTHI, S., *et al.* Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulphydryl oxidase, QSOX1. **Biochemical Journal**, v. 404. p. 403-411, 2007.
- CHEN, X., *et al.* The potentiation role of hepatopoietin on activator protein-1 is dependent on its sulphydryl oxidase activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 278. n. 49, p. 49022-49030, 2003.
- COPPOCK, D., *et al.* Regulation of the quiescence-induced genes: Quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269. n. 2, p. 604-610, 2000.

- COPPOCK, D. J. European-Monetary-Union - Lessons from the Classical Gold Standard - Panic,M. **Manchester School of Economic and Social Studies**, v. 61. n. 2, p. 218-220, 1993.
- COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: Thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v. 54. n. 3, p. 460-468, 1998.
- COPPOCK, D. L., *et al.* Preferential Gene-Expression in Quiescent Human Lung Fibroblasts. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4. n. 6, p. 483-493, 1993.
- COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8. n. 3-4, p. 300-311, 2006.
- DE ANDRADE, C. R., *et al.* Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 47. n. 10, p. 716-727, 2011.
- ELLER-BORGES, R., *et al.* Ras, Rac1, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling in nitric oxide induced endothelial cell migration. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 47. p. 40-51, 2015.
- GANDHI, C. R., *et al.* A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. **Hepatology**, v. 29. n. 5, p. 1435-1445, 1999.
- GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell death & disease**, v. 2. p. e213, 2011.
- HECKLER, E. J., *et al.* Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 47. n. 17, p. 4955-4963, 2008.
- HELLEBREKERS, D. M. E. I., *et al.* Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. **Cancer Research**, v. 67. n. 9, p. 4138-4148, 2007.
- HOFHAUS, G., *et al.* Highly divergent amino termini of the homologous human ALR and yeast scERV1 gene products define species specific differences in cellular localization. **European Journal of Cell Biology**, v. 78. n. 5, p. 349-356, 1999.
- ILANI, T., *et al.* A Secreted Disulfide Catalyst Controls Extracellular Matrix Composition and Function. **Science**, v. 341. n. 6141, p. 74-76, 2013.

- ISRAEL, B. A., *et al.* Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69. p. 129-135, 2014.
- JAJE, J., *et al.* A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, v. 46. n. 45, p. 13031-13040, 2007.
- JANISZEWSKI, M., *et al.* Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 280. n. 49, p. 40813-40819, 2005.
- KATCHMAN, B. A., *et al.* Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 Promotes Invasion of Pancreatic Tumor Cells Mediated by Matrix Metalloproteinases. **Molecular Cancer Research**, v. 9. n. 12, p. 1621-1631, 2011.
- KATCHMAN, B. A., *et al.* Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 15. n. 2, 2013.
- KODALI, V. K.; THORPE, C. Oxidative Protein Folding and the Quiescin-Sulfhydryl Oxidase Family of Flavoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13. n. 8, p. 1217-1230, 2010.
- LAKE, D. F.; FAIGEL, D. O. The emerging role of QSOX1 in cancer. **Antioxidants & redox signaling**, v. 21. n. 3, p. 485-496, 2014.
- LANGE, H., *et al.* An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. **Embo Reports**, v. 2. n. 8, p. 715-720, 2001.
- LEE, M. Y., *et al.* Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29. n. 4, p. 480-487, 2009.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141. n. 7, p. 1117-1134, 2010.
- LI, Y., *et al.* Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275. n. 48, p. 37443-37447, 2000.
- MAIRET-COELLO, G., *et al.* FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: Topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central

nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 473. n. 3, p. 334-363, 2004.

MAIRET-COELLO, G., *et al.* Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 484. n. 4, p. 403-417, 2005.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 9. n. 3, p. 153-166, 2009.

MATSUBA, S., *et al.* Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 30. n. 1, p. 50-62, 2002.

MCCUBREY, J. A., *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773. n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MEBAZAA, A., *et al.* Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. **European Heart Journal**, v. 33. n. 18, p. 2317-2324, 2012.

MOREL, C., *et al.* Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. **Experimental cell research**, v. 313. n. 19, p. 3971-3982, 2007.

MORLA, A. O.; WANG, J. Y. Protein tyrosine phosphorylation in the cell cycle of BALB/c 3T3 fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83. n. 21, p. 8191-8195, 1986.

MUSARD, J. F., *et al.* Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287. n. 1, p. 83-91, 2001.

OUYANG, X., *et al.* Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 65. n. 15, p. 6773-6779, 2005.

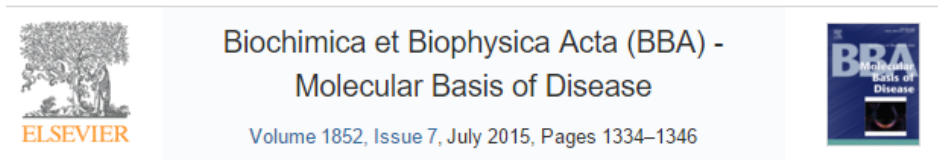
PERNODET, N., *et al.* High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 14. n. 5, 2012.

- PESCATORE, L. A., *et al.* Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 287. n. 35, p. 29290-29300, 2012.
- POLIMENO, L., *et al.* Decreased expression of the augmenter of liver regeneration results in increased apoptosis and oxidative damage in human-derived glioma cells. **Cell death & disease**, v. 3. p. e289, 2012.
- PORTES, K. F., *et al.* Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **Journal of Molecular Histology**, v. 39. n. 2, p. 217-225, 2008.
- RADOM, J., *et al.* Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1759. n. 5, p. 225-233, 2006.
- RAJE, S.; GLYNN, N. M.; THORPE, C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. **Analytical biochemistry**, v. 307. n. 2, p. 266-272, 2002.
- RANCY, P. C.; THORPE, C. Oxidative Protein Folding in Vitro: A Study of the Cooperation between Quiescin-Sulfhydryl Oxidase and Protein Disulfide Isomerase. **Biochemistry**, v. 47. n. 46, p. 12047-12056, 2008.
- RUDOLF, J.; PRINGLE, M. A.; BULLEID, N. J. Proteolytic processing of QSOX1A ensures efficient secretion of a potent disulfide catalyst. **Biochemical Journal**, v. 454. p. 181-190, 2013.
- SEVIER, C. S. Erv2 and Quiescin Sulfhydryl Oxidases: Erv-Domain Enzymes Associated with the Secretory Pathway. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16. n. 8, p. 800-808, 2012.
- SIMPER, D., *et al.* Comparative Proteomics Profiling Reveals Role of Smooth Muscle Progenitors in Extracellular Matrix Production. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30. n. 7, p. 1325-U1127, 2010.
- SOBOTTA, M. C., *et al.* Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. **Nature chemical biology**, v. 11. n. 1, p. 64-70, 2015.
- SOLOVIEV, M., *et al.* Elevated Transcription of the Gene QSOX1 Encoding Quiescin Q6 Sulfhydryl Oxidase 1 in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 8. n. 2, 2013.

- SONG, H., *et al.* Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. **Oncogene**, v. 28. n. 37, p. 3307-3319, 2009.
- SZOCS, K., *et al.* Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 22. n. 1, p. 21-27, 2002.
- THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: Emerging roles for a new flavoprotein family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282. n. 19, p. 13929-13933, 2007.
- WANG, G., *et al.* Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274. n. 17, p. 11469-11472, 1999.
- WANG, Y., *et al.* Hepatopoietin interacts directly with COP9 signalosome and regulates AP-1 activity. **Febs Letters**, v. 572. n. 1-3, p. 85-91, 2004.
- ZANATA, S. M., *et al.* High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Report**, v. 10. n. 6, p. 319-323, 2005.
- ZHENG, W. Y., *et al.* Exploring the Smallest Active Fragment of HsQSOX1b and Finding a Highly Efficient Oxidative Engine. **PLoS ONE**, v. 7. n. 7, 2012.

10. ANEXO

Artigo publicado durante o mestrado como colaboradora.



The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth

Beatriz E. Borges^{a, 1}, Márcia H. Appel^{a, 1, 2}, Axel R. Cofré^{a, 1}, Maiara L. Prado^a, Chelin A. Steclan^a, Frédéric Esnard^b, Silvio M. Zanata^a, Francisco R.M. Laurindo^c, Lia S. Nakao^a 